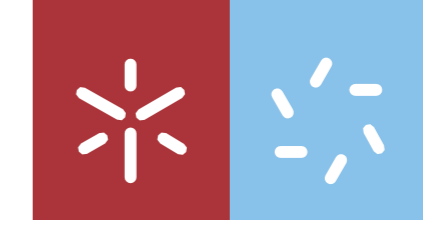




Joana de Sousa e Castro

Fatores que condicionam a comunidade fúngica da  
azeitona: uma perspetiva para o controlo da gafa da  
oliveira

Universidade do Minho  
Escola de Ciências







Universidade do Minho  
Escola de Ciências

Joana de Sousa e Castro

**Fatores que condicionam a comunidade  
fúngica da azeitona: uma perspetiva para o  
controlo da gafa da oliveira**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia  
e Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Maria Teresa Correia  
Guedes Lino Neto**  
e  
**Professora Doutora Paula Cristina dos Santos  
Baptista**

## Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Agradecimentos

Após a conclusão deste trabalho, a gratidão é o meu sentimento predominante.

Ter a oportunidade de desenvolver este trabalho foi um privilégio, permitiu-me aumentar o conhecimento científico, interpessoal e, sobretudo, pessoal. Assim, agradeço à Professora Teresa Lino Neto, por quem nutro uma admiração para além da intelectualidade, que tornou isto possível. Agradeço também à Professora Paula Baptista e ao Vitor Ramos, que tiveram um contributo fulcral para a realização deste trabalho, pelo suporte e consideração.

Àqueles que rotineiramente me acompanharam no Laboratório de Biologia Funcional de Plantas, um agradecimento por tornarem os fracassos menos difíceis e as vitórias mais apreciadas. Agradeço especialmente à Daniela Costa, que me ensinou, para além da componente técnica, a importância da simbiose. Agradeço-lhe o exemplo e ressalvo que o mérito deste trabalho é também, inequivocamente, mérito seu.

À família e amigos, agradeço terem-me proporcionado as condições primordiais necessárias para a realização deste trabalho. Ao meu companheiro Carlos Pinto agradeço ainda o reconfortante contributo técnico.

Todos desempenharam um papel memorável neste que, para mim, foi um mágico capítulo.

Obrigada!

“Acredito que as células nos ensinam não apenas os mecanismos da vida, mas também como viver de modo enriquecedor e pleno.”

Bruce H. Lipton

Este trabalho contou com o apoio da FEDER através do Programa de Competitividade Operacional (COMPETE) e de fundos nacionais portugueses através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-031133.

## **Declaração de integridade**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

### Fatores que condicionam a comunidade fúngica da azeitona: uma perspetiva para o controlo da gafa da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) desempenha um relevante papel socioeconómico a nível mundial. Contudo, a obtenção da azeitona e do seu derivado – o azeite – é limitada pela doença da gafa. Esta doença incide em cerca de 30-50% dos olivais portugueses e leva à queda prematura e/ou mumificação dos frutos, com conseqüente redução de produção e/ou depreciação da qualidade do azeite. A estratégia predominante no combate à gafa é baseada na luta química, com a aplicação de fúngicidas cúpricos. No entanto, a atual consciencialização do impacto destes produtos, na saúde e no meio ambiente, tem evidenciado a necessidade da criação de alternativas mais ecológicas, como sejam as abordagens de biocontrolo. Sabe-se que o microbioma da oliveira desempenha um papel crucial na proteção do hospedeiro contra doenças. Posto isto, este trabalho teve como principal objetivo, avaliar as potencialidades do microbioma nativo da oliveira na luta biológica contra a doença da gafa. Assim, a capacidade inibitória de fungos *Penicillium* spp. previamente isolados de folhas e ramos de oliveiras, foi avaliada contra fungos *Colletotrichum* spp. Os ensaios de antagonismo foram realizados em co-cultura *in vitro*. Os resultados indicaram que as espécies de *Penicillium* inibem o crescimento de *Colletotrichum* spp. devido a mecanismos de antibiose, induzindo alterações morfológicas nas hifas dos fungos patogénicos, como sejam a sua ramificação ou agregação de hifas. A comunidade microbiana endofítica e epifítica da azeitona foi também avaliada por *metabarcoding*, recorrendo ao *barcode* ITS e à plataforma *Illumina MiSeq*. As comunidades fúngicas foram avaliadas em azeitonas em dois estados de maturação (verdes e semi-maduras), provenientes de diferentes cultivares de oliveira (Cobrançosa e Madural), com diferentes regimes de produção (agricultura biológica e produção integrada). A riqueza relativa das ordens *Hypocreales* e *Xylariales* relacionou-se positivamente com a tolerância das azeitonas à doença da gafa, assim como a abundância de *Aureobasidium* spp.. Por outro lado, a riqueza relativa da ordem *Dothideales* relacionou-se positivamente com a maior suscetibilidade das azeitonas à doença. Com este trabalho, foi possível identificar potenciais géneros e espécies bioprotetoras da oliveira para além de *Penicillium* spp.. Na generalidade, este trabalho contribuiu para realçar as variações que ocorrem na comunidade fúngica epifítica e endofítica em azeitonas, as quais poderão contribuir para potenciar ou reduzir o desenvolvimento da doença da gafa.

Palavras-chave: *Olea europaea* (L.); Azeitona; Comunidades epifíticas e endofíticas; *Colletotrichum* spp.; Biocontrolo; Antagonismo



## Abstract

### Factors that shape the olive fungal community: a perspective for the control of anthracnose in the olive tree

The olive tree (*Olea europaea* L.) plays an important socio-economic role worldwide, but olives are frequently affected by anthracnose (caused by *Colletotrichum* spp.). This disease affects 30-50% of portuguese olive groves and leads to premature fall and/or mummification of fruits, with a consequent reduction in production and/or depreciation of olive oil quality. The control of this disease is very difficult and mostly relies on the use of copper-based fungicides. The current awareness of the impact of these products on health and environment has highlighted the importance of creating ecological alternatives, such as biocontrol approaches. The plant-associated microbial community has been increasingly recognized as playing an important role in plant health. The main objective of this work was to evaluate the potential of the native microbiome of the olive tree for the biocontrol of anthracnose. Thus, the inhibitory capacity of fungi *Penicillium* spp. previously isolated from apparently healthy olive leaves and branches, it was evaluated against *Colletotrichum* spp. fungi obtained from olives that had symptoms of anthracnose. The antagonism assays were performed *in vitro* by dual-cultural methods and indicated that the *Penicillium* species inhibited the growth of *Colletotrichum* spp. due to antibiosis mechanisms and induced morphological changes in the *Colletotrichum* spp. hyphae. The anomalies observed consisted on the branching or aggregation of hyphae. Using a *metabarcoding* approach, through the sequencing (*Illumina MiSeq*) of ITS amplicons, fungal diversity was determined in olives from different olive cultivars (Cobrançosa and Madural), from different production systems (organic farming and integrated production) and in two maturation stages (green and semi-ripen). The relative richness of the *Hypocreales* and *Xylariales* orders was positively related to the tolerance of olives to anthracnose, as well as the abundance of *Aureobasidium* spp.. On the other hand, the relative richness of the order Dothideales was positively related to the greater susceptibility of olives to disease. With this work, it was possible to identify potential genera and bioprotective species of the olive tree in addition to *Penicillium* spp.. In general, this work contributed to highlight the variations that occur in the epiphytic and endophytic fungal community in olives, which may contribute to potentiate or reduce the development of anthracnose.

Key-words: *Olea europaea* (L.); Olive; Epiphytic and endophytic communities; *Colletotrichum* spp.; Biocontrol; Antagonism

# Índice Geral

Índice de Figuras .....	x
Índice de Tabelas .....	xii
1. Introdução .....	1
1.1. Descrição botânica de <i>Olea europaea</i> .....	2
1.2. Origem e distribuição de <i>Olea europaea</i> .....	4
1.3. Variedades e cultivares de <i>Olea europaea</i> .....	6
<i>Cultivar Cobrançosa</i> .....	6
<i>Cultivar Madural</i> .....	7
1.4. Modos de produção e relação com o microbioma da oliveira .....	7
1.5. Impacto e sintomatologia da doença da gafa em oliveira .....	9
1.6. Os agentes causais da doença da gafa em oliveira .....	10
<i>Distribuição dos complexos de Colletotrichum causadores da doença da gafa</i> .....	11
<i>Processo de infeção da oliveira</i> .....	12
1.7. O controlo da doença da gafa da oliveira .....	13
<i>Medidas de biocontrolo</i> .....	14
1.8. Objetivos da tese .....	15
1.9. Referências bibliográficas .....	15
2. Interações <i>Penicillium</i> spp./ <i>Colletotrichum</i> spp. <i>in vitro</i> .....	24
2.1. Introdução .....	25
2.2. Material e métodos .....	26
<i>Material biológico</i> .....	26
<i>Identificação molecular dos isolados</i> .....	27
<i>Preparação das suspensões de esporos (inóculos)</i> .....	27
<i>Avaliação da taxa de crescimento dos fungos</i> .....	28
<i>Interações intraespecíficas à distância</i> .....	28
<i>Interações entre Penicillium spp. e Colletotrichum spp.</i> .....	29
2.3. Resultados e discussão .....	30
<i>Identificação dos isolados de oliveira</i> .....	30
<i>Taxa de crescimento dos isolados</i> .....	33
<i>Interações intraespecíficas à distância</i> .....	33
<i>Interações Penicillium spp./Colletotrichum spp.</i> .....	34
2.4. Conclusão .....	38
2.5. Referências bibliográficas .....	39
3. Avaliação da comunidade fúngica da azeitona por <i>metabarcoding</i> .....	43
3.1. Introdução .....	44
3.2. Material e métodos .....	45
<i>Material biológico e amostragem</i> .....	45
<i>Preparação das amostras de azeitona para obtenção de DNA endofítico e epifítico</i> .....	47
<i>Extração e amplificação de DNA dos fungos</i> .....	48
<i>Sequenciação e processamento de dados</i> .....	48
<i>Análise de diversidade e similaridade</i> .....	49
3.3. Resultados e discussão .....	50

<i>Qualidade, quantidade e amplificação de DNA</i> .....	50
<i>Resultados de sequenciação e controlo de qualidade</i> .....	52
<i>Análise global da comunidade fúngica epifítica e endofítica da azeitona</i> .....	53
<i>Comparação da comunidade fúngica de azeitonas em diferentes estados de maturação, modos de produção e cultivares</i> .....	58
<i>Grupos fúngicos potencialmente envolvidos na suscetibilidade e tolerância das oliveiras à doença da gafa</i> .....	64
3.4. Conclusão .....	73
3.5. Referências bibliográficas .....	75
4. Conclusão.....	80
5. Anexos.....	83

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Classificação taxonómica de <i>Olea europaea</i> L. Adaptado de Olive Oil Source (2020) ...	2
<b>Figura 2.</b> <i>Olea europaea</i> L.: a) árvore; b) galho; c) flor perfeita; d) fruto; e) fruto maduro; f) corte transversal do fruto maduro; g) endocarpo (caroço). Adaptado de Humphries (2005) e Haifa Group (2014).....	3
<b>Figura 3.</b> Produção mundial de azeitonas. Adaptado de FAO (2018).....	5
<b>Figura 4.</b> Distribuição do olival e suas cultivares em Portugal. Mapa preparado com dados obtidos pela Direção Geral do Território (2018), estando indicada a distribuição das cultivares de oliveira, segundo Cordeiro & Inês (2016). .....	5
<b>Figura 5.</b> Fruto e respetivo endocarpo (caroço) das cultivares Cobrançosa (a) e Madural (b). Adaptado de Cordeiro et al. (2010, 2011).....	7
<b>Figura 6.</b> Azeitonas com sintomatologia da doença da gafa: a) acérvulos sobre o fruto b) fruto mumificado. In: Ulivita (2017) e Agro-Manual (2016) .....	10
<b>Figura 7.</b> Distribuição geográfica dos registos de doença da gafa na bacia do Mediterrâneo e frequência relativa das espécies de <i>Colletotrichum</i> . Adaptado de Talhinhos et al. (2018) .....	12
<b>Figura 8.</b> Processo de infeção de <i>Colletotrichum</i> spp.: (I) fixação do conídio à superfície do hospedeiro; (II) germinação do conídio; (III) formação do apressório; (IV) penetração da cutícula do hospedeiro; (V) crescimento e colonização nos tecidos vegetais; e (VI) formação de acérvulos e esporulação. Adaptado de de Silva (2017). .....	13
<b>Figura 9.</b> Preparação de suspensões de esporos complexas a partir de suspensões simples (A, B, e C) com esporos de um isolado. Suspensão complexa AB: adição de duas suspensões simples A e B (1:1) de fungos. Suspensão complexa ABC: adição de três suspensões simples A, B e C (1:1:1) de fungos. ....	28
<b>Figura 10. a.</b> Preparação das interações fúngicas intraespecíficas: foram utilizados inóculos de 5 µl de suspensões de fungos [106 esporos/mL] para preparar culturas duplas e os respetivos controlo (em triplicado); todas as culturas foram fotografadas diariamente até contato micelial. <b>b.</b> Preparação de interações de <i>Penicillium</i> spp. / <i>Colletotrichum</i> spp.: para cada interação foram estabelecidas três réplicas de <i>Penicillium</i> spp./ <i>Colletotrichum</i> spp., três controlos <i>Penicillium</i> spp./ <i>Penicillium</i> spp. e três controlos de <i>Colletotrichum</i> spp./ <i>Colletotrichum</i> spp. Cada inóculo correspondeu a 5 µL de suspensão de esporos do respetivo fungo [106 esporos/mL]. Todas as culturas foram fotografadas diariamente, nos três dias seguintes á inoculação. ....	29
<b>Figura 11.</b> Classificação das interações entre fungos, de acordo com as categorias definidas por Boddy (2000) .....	30
<b>Figura 12.</b> Separação eletroforética dos amplicões correspondentes às regiões ITS dos isolados fúngicos, obtidos a partir de órgãos de oliveira. As regiões ITS foram amplificadas com os primers universais ITS1-F e ITS4 e separadas num gel de agarose (1 %, p/v). C1 a C4: IPB-C1 a IPB-C4; P1 a P3: IPB-P1 a IPB-P3; C-: controlo negativo, M: Marcador molecular 100 bp. ....	31
<b>Figura 13.</b> Morfologia dos esporos dos isolados estudados: IPB-C1 – <i>Fusarium</i> sp.; IPC-C2 – <i>Colletotrichum acutatum</i> ; IPB-C3 – <i>C. fiorinae</i> ; IPB-C4 – <i>C. nymphaeae</i> ; IPB-P1 – <i>Penicillium aff. commune</i> ; IPB-P2 – <i>P. lilacinum</i> ; IPB-P3 – <i>P. roseopurpureum</i> . Barra lateral corresponde a 50 µm.....	32
<b>Figura 14.</b> Variação da área (cm <sup>2</sup> ) ocupada pelos diferentes fungos ao longo do tempo, em ensaios de co-cultura intraespecífica. Os valores obtidos pelo crescimento do isolado em cultura dupla (•	

•) são comparados com a situação controlo (•). *: diferença estatística com significância de 5 % (n = 3).....	34
<b>Figura 15.</b> Tipo de interações observadas ao fim de 15 dias após inoculação em meio PDA. a: inibição de contato ( <i>P. lilacinum</i> / <i>C. acutatum</i> + <i>C. fiorinae</i> ; b: inibição à distância ( <i>P. lilacinum</i> / <i>C. fiorinae</i> ).....	36
<b>Figura 16.</b> Co-culturas em que se verificou interação de contacto do tipo 2 (inibição à distância) e diminuição do IVCM de <i>Colletotrichum</i> spp. em interações à distância. a: <i>P. aff. commune</i> / <i>C. acutatum</i> + <i>C.fiorinae</i> ; b: <i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> / <i>C. acutatum</i> + <i>C.fiorinae</i> ; c: <i>P. aff. commune</i> / <i>C.fiorinae</i> ; d: <i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> / <i>C.fiorinae</i> ; e: <i>P. lilacinum</i> + <i>P. roseopurpureum</i> / <i>C. fiorinae</i> . .....	37
<b>Figura 17.</b> Hifas de <i>Colletotrichum</i> spp. na situação controlo e de co-cultura. Co-cultura: a- <i>P. aff. commune</i> / <i>C. acutatum</i> + <i>C.fiorinae</i> ; b- <i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> / <i>C. acutatum</i> + <i>C.fiorinae</i> ; c- <i>P. aff. commune</i> / <i>C.fiorinae</i> ; d- <i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> ..	38
<b>Figura 18.</b> Amostras recolhidas para avaliação da comunidade endofítica e epifítica por metabarcoding. De cada regime de cultivo foram amostrados dois cultivares de oliveira (Cobrançosa e Madural), tendo sido recolhidas azeitonas verdes (75 g) e semi-maduras de cinco árvores aparentemente saudáveis. ....	46
<b>Figura 19.</b> Observação com a lupa eletrónica de azeitona picada por <i>Bactrocera oleae</i> .....	46
<b>Figura 20.</b> Separação eletroforética representativa dos amplicões correspondentes às regiões ITS dos epífitos (a) e endófitos (b) isolados da oliveira. As regiões ITS foram amplificadas com os primers universais ITS1-F-ITS4 (a) e ITS3-ITS4 (b), sendo os produtos de PCR separados num gel de agarose (1%,p/v). A: Amplificação de DNA epifítico; B: Amplificação de DNA endofítico; C-: controlo negativo, M: Marcador molecular 100 bp.....	52
<b>Figura 21.</b> Abundância relativa (a) e riqueza (b) dos fungos isolados das azeitonas, considerando ambas as comunidades, a epifítica e a endofítica. Os gráficos foram construídos usando a ferramenta interativa Krona (Ondov et al., 2011).....	54
<b>Figura 22.</b> Abundância relativa (a) e riqueza (b) das ordens fungicas epifíticas e endofítica associadas à azeitona. Ordens com abundância relativa e/ou riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.....	55
<b>Figura 23.</b> Curvas de rarefação para as amostras fúngicas epifíticas (a) e endofíticas (b) da azeitona, tendo em consideração aquelas obtidas para azeitonas verdes ou semi-maduras, ou para a cv. Madural ou cv. Cobrançosa. As curvas de rarefação foram obtidas no software Past3 v3.26 .....	57
<b>Figura 24.</b> Análise Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) para verificação do agrupamento das comunidades fúngicas endofíticas e epifíticas pelo coeficiente de Bray-Curtis (2D Stress = 0,18).....	58
<b>Figura 25.</b> Abundâncias relativas (a) e riqueza (b) das ordens fúngicas endofíticas e epifíticas associadas a azeitonas provenientes de diferentes estados de maturação, modos de produção e cultivares, revelada por metabarcoding.. Ordens com abundância relativa e/ou riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda. ....	61
<b>Figura 26.</b> Análises Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) para verificação do agrupamento das comunidades fúngicas epifíticas (a) e endofíticas (b,c) pelo coeficiente de Bray-Curtis (2D Stress = 0,18). ....	64
<b>Figura 27.</b> Diagrama de Venn com as ASVs exclusivas e compartilhadas entre a comunidade fúngica: (a) das azeitonas verdes de agricultura biológica (AB) e de produção integrada (PI); (b)	

das azeitonas verdes (V) e semi-maduras (SM) de produção integrada; (c) das azeitona Madural (M) e Cobrançosa (C).....	66
<b>Figura 28.</b> Riqueza fúngica exclusiva de azeitonas verdes biológicas (AB) e provenientes de produção integrada (PI). Ordens com riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.....	66
<b>Figura 29.</b> Riqueza fúngica exclusiva de azeitonas verdes (V) e semi-maduras (SM) de produção integrada. Ordens com riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda. ....	68
<b>Figura 30.</b> Riqueza fúngica exclusiva de azeitonas Cobrançosa (C) e Madural (M). Ordens com riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.....	68
<b>Figura 31.</b> Diagrama de Venn com as ASVs exclusivas e compartilhadas entre a comunidade fúngica epifítica (a) e endofítica (b) de azeitonas das cvs. Madural (M) e Cobrançosa (C). ....	69
<b>Figura 32.</b> Abundâncias relativas e riqueza dos grupos taxonómicos epifíticos (a) e endofíticos (b) presentes exclusivamente em azeitonas da cv. Cobrançosa e Madural.....	70
<b>Figura 33.</b> Abundâncias relativas das ordens fúngicas endofíticas associadas a azeitonas provenientes de produção integrada. Ordens com abundância relativa e/ou riqueza superior a 1% estão representados na legenda.....	73

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos isolados por barcoding, utilizando o <i>barcode</i> para fungos (ITS). Os isolados estão identificados pelo seu código, sendo também apresentado entre parêntesis a sua prévia identificação. Os três melhores top-hits estão descritos para cada sequência (o número entre parêntesis é o número de hits para cada espécie). ....	31
<b>Tabela 2.</b> Valor médio do raio das colónias (cm) dos isolados, após sete dias de incubação a 23 °C, no escuro, em meio PDA. ....	33
<b>Tabela 3.</b> Tipos de interação entre <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp. avaliadas ao fim de 3 e de 15 dias após inoculação. As interações foram classificadas com base na razão dos índices de velocidade de crescimento microbiano registado em co-cultura [IVCM(cc)] e cultura simples [IVCM(c)], registados após três dias de inoculação. O tipo de interação em que se verificou a diminuição de IVCM de <i>Colletotrichum</i> spp. estão assinaladas a negrito. O tipo de interação de contacto foi definido após 15 dias da inoculação, sendo apresentado com a simbologia descrita na Tabela 1., .....	35
<b>Tabela 4.</b> Amostras recolhidas para avaliação da comunidade endofítica e epifítica por metabarcoding. De cada regime de cultivo foram amostrados dois cultivares de oliveira (Cobrançosa e Madural), tendo sido recolhidas azeitonas verdes (75 g) e semi-maduras de cinco árvores aparentemente saudáveis. árvore/cultivar/regime de cultivo foram colhidas 75g de azeitonas. As amostragens foram efetuadas a 25 de setembro de 2019 (azeitonas verdes) e repetida a 17 de outubro de 2019 (azeitonas semi-maduras). ....	47
<b>Tabela 5.</b> Avaliação da quantidade (ng/μL) e qualidade (avaliada pelas razões A260/A230, A260/A280) do DNA extraído das amostras de epífitos e de endófitos da azeitona. Os valores em itálico assinalam os valores de concentrações abaixo de 50 ng/μL, enquanto os valores a sublinhado representam os valores de A260/A230 inferiores a 1,8. ....	51
<b>Tabela 6.</b> Número de raw reads ITS2 em cada amostra, bem como o número de réplicas considerado e número de ASVs finais.....	53

<b>Tabela 7.</b> Riqueza fúngica ( $S$ ) e índices de diversidade [Simpson ( $1-D$ ) e Shannon ( $H'$ )] das amostras epifíticas e endofíticas de azeitonas com diferentes estados de maturação, provenientes de modos de produção e cultivares distintos. Os resultados são representados pelo valor médio $\pm$ DP. Letras sobrescritas denotam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), onde as letras maiúsculas (A-B) se referem à diferença entre epífitos e endófitos e as minúsculas (a-b) entre os estados de maturação/modo de produção/cultivar. As diferenças significativas estão destacadas a negrito.....	60
<b>Tabela 8.</b> Resultados do teste estatístico ANOSIM com base no índice de Bray-Curtis para a comunidade fúngica epifítica, endofítica e total da azeitona. Os resultados são representados pelo valor de $R$ e $p$ . As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão destacadas a negrito.....	63
<b>Tabela 9.</b> Riqueza fúngica ( $S$ ) das amostras epifíticas e endofíticas da azeitona, provenientes de estados de maturação, modos de produção e cultivares diferentes. Os resultados são representados pelo valor médio $\pm$ DP. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão evidenciadas por letras maiúsculas sobrescritas (A-B) quanto aos modos de produção, maiúsculas sobrescritas (a-b) quanto aos estados de maturação e letras gregas sobrescritas ( $\alpha$ - $\beta$ ) quanto aos cultivares, respetivamente.....	65
<b>Tabela 10.</b> Resultados do teste estatístico ANOSIM com base no coeficiente de Bray-Curtis entre grupos fúngicos provenientes de azeitonas que variam apenas no estado de maturação (a), modo de produção (b) ou cultivar (c). Os resultados são representados pelo valor de $R$ e $p$ . As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão destacadas a negrito.....	72

## 1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie cultivada principalmente para a produção de fruto – azeitona – e para fins ornamentais. O fruto é o seu derivado com maior interesse económico, sendo comercializado como ‘azeitona de mesa’ ou utilizado na produção de azeite (Maldonado *et al.* 2016). A área de olival mundial tem vindo a aumentar progressivamente, atingindo em 2018 cerca de 10,6 Mha (FAO, 2019). Estes valores são justificados pelo crescente consumo mundial de ‘azeitonas de mesa’ (IOC, 2018) e de azeite (IOC, 2016). De facto, a oliveira é uma das frutícolas mais importantes da bacia mediterrânica (Porfírio *et al.* 2016) e Portugal é um dos 10 maiores produtores mundiais de azeitona (FAO, 2019). As previsões agrícolas apontam para que, em 2020, se verifique a maior produção deste fruto a nível nacional desde 1941 (INE, 2020).

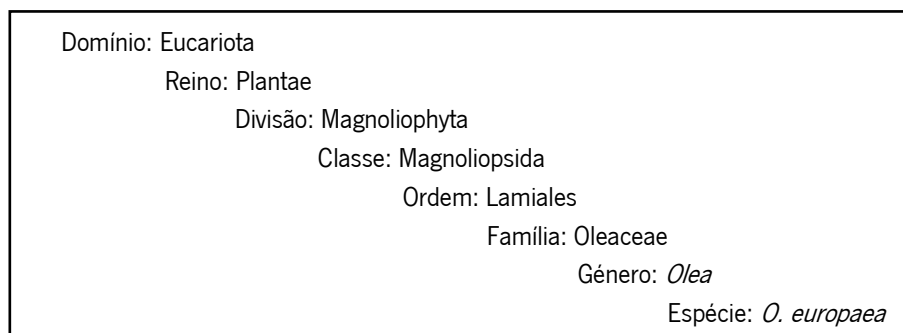
As variações da produção de azeitona devem-se sobretudo ao impacto das alterações climáticas e ao crescimento dos olivais intensivos e superintensivos (Dawson, 2020). Estes representam atualmente cerca de 63% dos olivais portugueses e permitiram aumentar significativamente os níveis de produção de azeitona a nível nacional (Dawson, 2020). No entanto, estes sistemas de produção são altamente controversos do ponto de vista ecológico, uma vez que potenciam a erosão do solo e a contaminação da água com fertilizantes e pesticidas (Beaufoy, 2001; Camarsa *et al.* 2010). Graças ao aumento da procura por azeitonas de elevada qualidade e obtidas de forma sustentável, as práticas tradicionais de agricultura acabaram por persistir (Muños-Rojas & Pinto-Correia, 2018).

As pragas e doenças são fatores que afetam a produção dos olivais, sendo a mosca da azeitona – *Bactrocera oleae* (Rossi) – uma das principais pragas da oliveira em Portugal (Coelho, 2016). Além de causar perdas importantes ao nível da produção da azeitona, causa também uma redução acentuada na qualidade do azeite (Malheiro, 2015). A mosca da azeitona serve ainda como vetor de agentes fitopatogénicos, conduzindo ao aparecimento e desenvolvimento de doenças da oliveira – como a doença da gafa (Sergeeva, 2010). A gafa é causada por diversas espécies de fungos pertencentes ao género *Colletotrichum*, sendo considerado o principal fator fitopatológico limitante da produção de azeitona em Portugal (Loureiro *et al.* 2018). Esta doença incide em cerca de 30-50% dos olivais portugueses e leva à queda prematura e/ou mumificação dos frutos, com consequente redução de produção e/ou depreciação da qualidade do azeite (Loureiro *et al.* 2018). Sabe-se ainda que a intensidade da virulência da doença é dependente das cultivares de oliveira (Loureiro *et al.* 2018). Existem cultivares, como a cv. *Cobrançosa*, que apresenta reduzida incidência desta doença e outras, como a cv. *Madural*, que são mais suscetíveis (Cordeiro *et al.* 2011).



### 1.1. Descrição botânica de *Olea europaea*

A oliveira pertence à família Oleaceae (Figura 1) – composta por 30 géneros (Cronquist, 1981). O género *Olea* compreende 30 espécies (Bracci *et al.* 2011), sendo a oliveira a espécie mais popular (Kaniewski *et al.* 2012) e a única usada como fonte de alimento (Sarwar, 2013). *O. europaea* L. surgiu como um híbrido entre as espécies *Olea ferruginea* x *Olea laperinii* (Sauer, 1993) e atualmente apresenta diversas cultivares, derivadas principalmente de seleções empíricas ao longo dos século (Cordeiro & Inês, 2016).



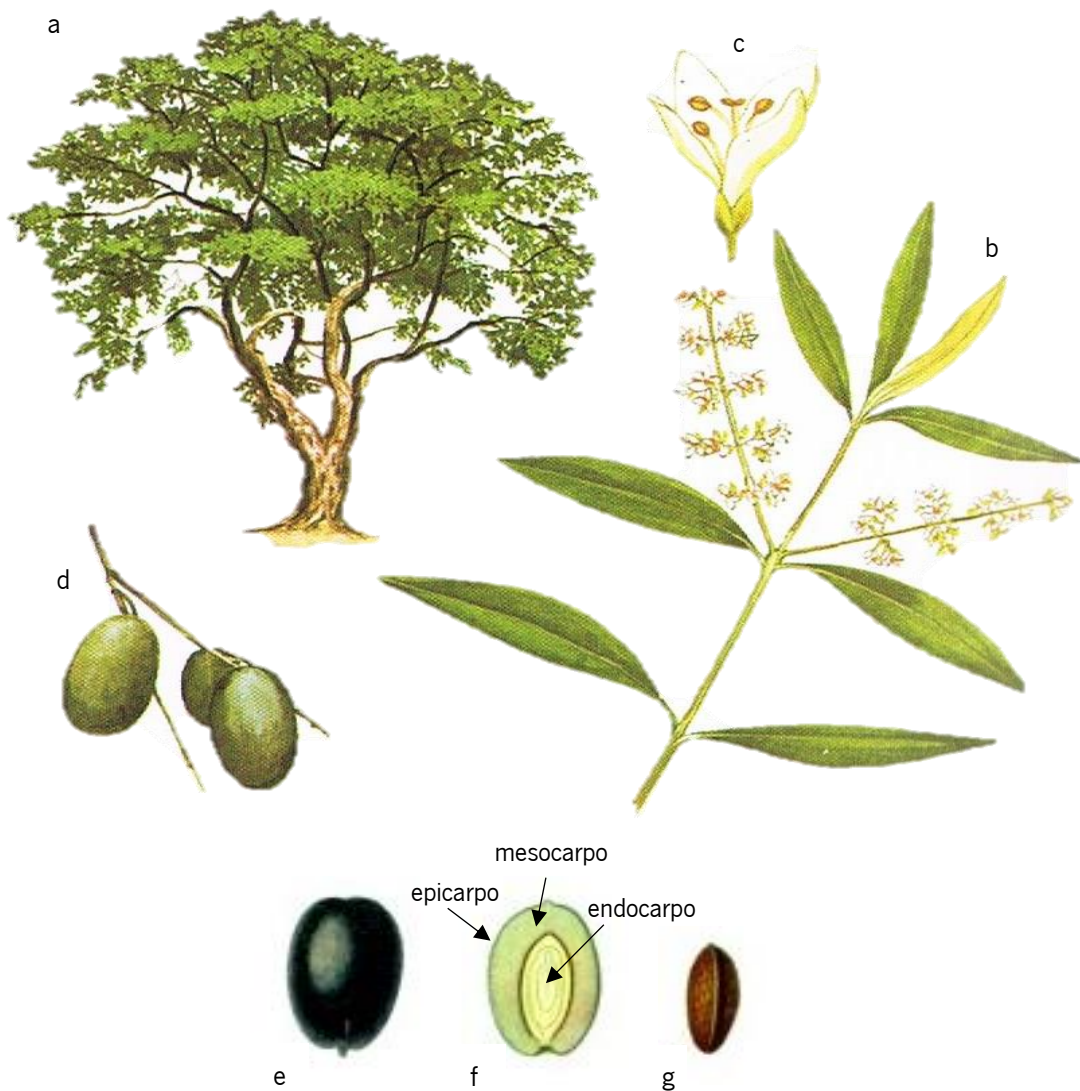
**Figura 1.** Classificação taxonómica de *Olea europaea* L. Adaptado de Olive Oil Source (2020)

A oliveira é uma espécie perene, lenhosa e com altura variável entre os 8 e 15 m, dependendo principalmente das condições climáticas (Haifa Group, 2014). Apresenta copa larga e um tronco grosso, curto, nodoso (Humphries, 2005), cinza pálido, geralmente dobrado e torcido (Figura 2.a) (Hashmi *et al.* 2015). É uma árvore de grande longevidade e, na região mediterrânica, cresce naturalmente em bosques abertos e matos de zonas secas/rochosas (Humphries, 2005).

As folhas são curtamente pecioladas (5 mm), lanceoladas, às vezes ovais, coriáceas, de margem inteira, verde-acinzentado-escuras e glabras na página superior, cinzento-esbranquiçadas e densamente escamosas na página inferior (Nasir, 1982), com 2-8 cm de comprimento e 0,5-1,5 cm de largura (Figura 2.b) (Humphries, 2005).

É uma espécie andromonóica (com flores perfeitas e pistiladas na mesma planta), polinizada pelo vento, com inflorescências paniculadas (Figura 2.b) (Naghiloo *et al.* 2013) e flores odoríferas de corola branca (Figura 2.c) (Humphries, 2005). Na zona mediterrânica, a iniciação floral ocorre no início do inverno, mas os botões florais e os primórdios das flores não são evidentes até março (Cuevas & Polito, 2004). A floração ocorre no final da primavera, tipicamente no final de maio, e dura aproximadamente duas semanas (Alagna *et al.* 2016). É uma planta anemófila e requer uma grande quantidade de pólen para obter fertilização satisfatória e, conseqüentemente, um rendimento de frutos adequado (Koubouris *et al.* 2009).

Os frutos da árvore (Figura 2.d), também denominados drupas, são constituídos por três partes anatômicas distintas: epicarpo; mesocarpo; e endocarpo lenhoso (Figura 2.f) que envolve a semente (Lanza & Serio, 2015). A superfície da azeitona é coberta por uma fina camada extracelular – a cutícula – que consiste principalmente em polímeros (cutina) e lipídios insolúveis (ceras) (Lanza & Serio 2015). O fruto é composto por água (50,0%), gordura (22,0%) e açúcar (19,1%), acompanhados de celulose (5,8%), proteínas (1,6%) e compostos inorgânicos (1,5%) (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Inicialmente, as azeitonas apresentam cor verde e têm até 2,5 cm de comprimento (Haifa Group, 2014). Com o processo de maturação, os frutos tornam-se progressivamente de cor púrpura escura, sendo que em algumas variedades permanecem verdes (Haifa Group, 2014). As características químicas e organolépticas dos frutos pode apresentar pequenas oscilações, que dependem essencialmente da cultivar, condições culturais e do estado de maturação do fruto (Bianchi, 2003; Hammami *et al.* 2011; Charoenprasert & Mitchell, 2012).



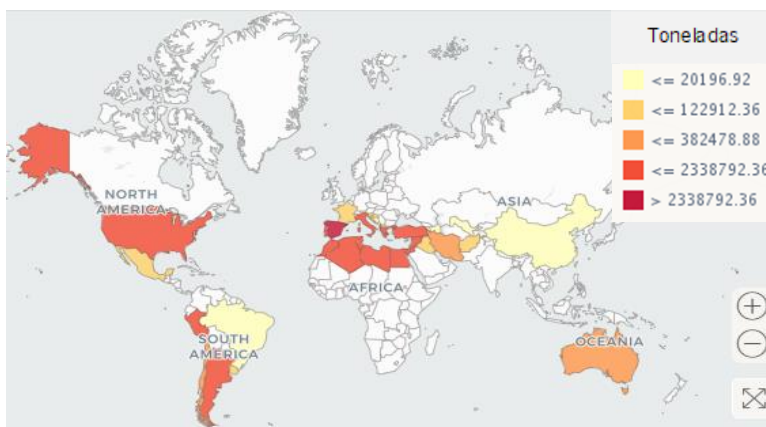
**Figura 2.** *Olea europaea* L.: a) árvore; b) galho; c) flor perfeita; d) fruto; e) fruto maduro; f) corte transversal do fruto maduro; g) endocarpo (caroço). Adaptado de Humphries (2005) e Haifa Group (2014).

As folhas e os frutos da oliveira contêm diversos compostos bioativos importantes para a indústria farmacêutica (Makowska-Wąs *et al.* 2017). Muitos desses compostos têm tido diferentes aplicações biomédicas inclusive, mais recentemente, ao nível das nanopartículas (Sulaiman *et al.* 2017). Atualmente, estão catalogados todos os compostos isolados de *O. europaea* L. num banco de dados – OliveNet™ (Bonvino *et al.* 2018), continuando a ser feitos esforços no sentido de identificar e caracterizar novos compostos desta espécie com potencial terapêutico (Ammar *et al.* 2017).

## 1.2. Origem e distribuição de *Olea europaea*

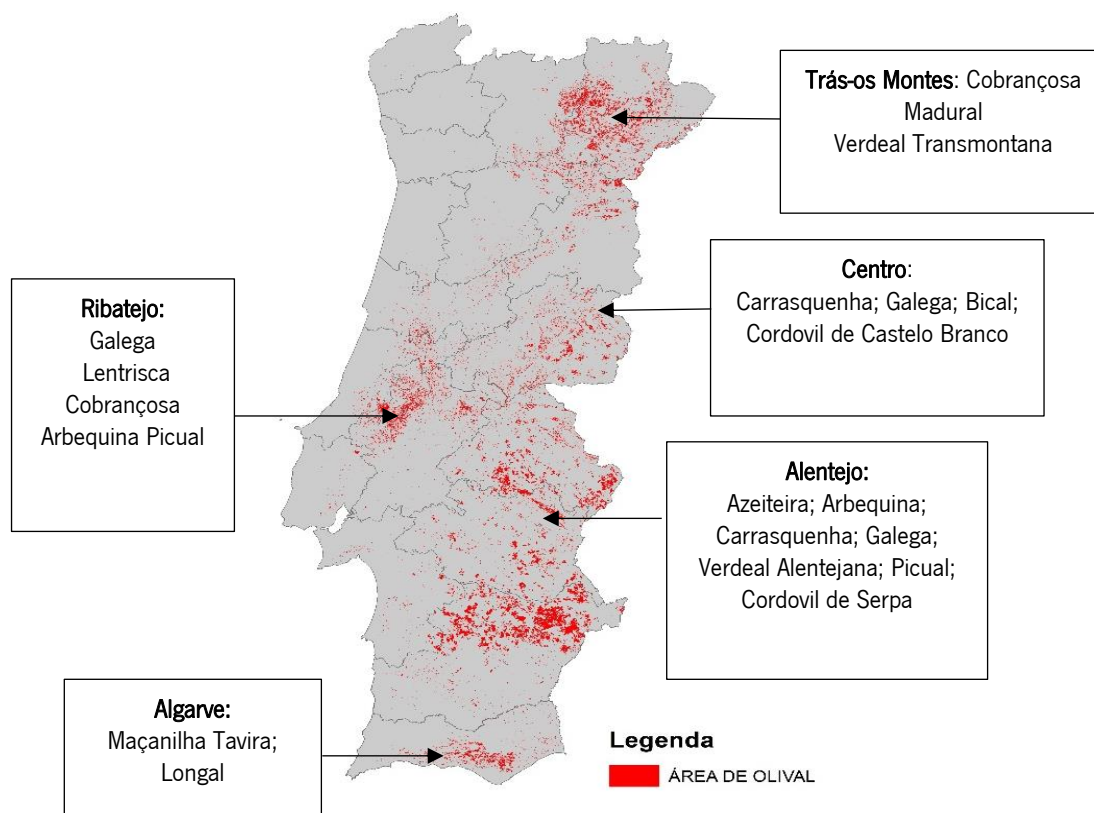
A zona oriental da bacia mediterrânica (sul da Turquia, Síria, Líbano, Palestina e Israel), é aceite como o local de origem da oliveira, dado que caroços de azeitona e fragmentos de madeira foram encontrados em tumbas antigas (Galili *et al.* 1997). Segundo Vossen (2007), por volta de 1000 a.C., os fenícios transportaram as azeitonas da costa oriental da bacia mediterrânica para a Espanha e norte de África. Os gregos levaram as árvores para a Itália e com a expansão do Império Romano ocorreu a disseminação das oliveiras por toda a bacia mediterrânica (Vossen, 2007). Estudos arqueobotânicos sugerem ainda que a domesticação da oliveira começou acerca de cinco/seis mil anos no Oriente Próximo (Kaniewski *et al.* 2012), sendo, possivelmente, uma das primeiras espécies de árvores a serem domesticadas (Sebastiani & Busconi, 2017). Desde há milénios que a sua produção tem sido de grande importância como fonte primária de gorduras (Marchese *et al.* 2016) e de compostos medicinais para as populações (Özcan & Matthäus, 2017). O consumo omnipresente e a robustez desta árvore perpetuaram o seu cultivo desde a Idade do Cobre até à atualidade (Galili *et al.* 1989).

Dado que a temperatura mínima é o fator ambiental que mais limita o crescimento e produção da oliveira (D'Angeli *et al.* 2003), a sua distribuição está circunscrita entre as latitudes de 30° e 45° nos dois hemisférios (Guerra *et al.* 2015). A temperaturas entre -5 °C e -10 °C ocorre a morte dos ramos do ano e abaixo de -10 °C verifica-se a morte da parte aérea (Cordeiro *et al.* 2019). Contudo, esta espécie é capaz de tolerar a secura e o calor (Rugini *et al.* 2016). Desse modo, a oliveira ocorre nas regiões costeiras da bacia mediterrânica, no norte da África, bem como no sul do Mar Cáspio (Figura 3). Contudo, a sua distribuição está em expansão como resultado do aumento no consumo de azeitona e azeite em todo o mundo, o que levou recentemente à sua produção em países como Estados Unidos, América do Sul, Austrália e China (Porfirio *et al.* 2016).



**Figura 3.** Produção mundial de azeitonas. Adaptado de FAO (2018).

Atualmente, cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na bacia mediterrânica, sendo que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia, Portugal, Chipre, Croácia, Eslovénia e Malta) são responsáveis por 64% da produção a nível mundial (FAO, 2019). A área que Portugal dedica às oliveiras é a quarta maior da União Europeia, correspondendo a 7% dos 4,7 Mha mundiais dedicados a esta cultura (FAO, 2019). As maiores regiões de cultivo de oliveira em Portugal encontram-se no Alentejo, que representa 50% da área total de olival, seguida de Trás-os-Montes (22%), Centro (18%); Ribatejo (7,7%) e Algarve (2,3%) (Figura 4) (Arias-Calderón *et al.* 2017).



**Figura 4.** Distribuição do olival e suas cultivares em Portugal. Mapa preparado com dados obtidos pela Direção Geral do Território (2018), estando indicada a distribuição das cultivares de oliveira, segundo Cordeiro & Inês (2016).

### 1.3. Variedades e cultivares de *Olea europaea*

A espécie *Olea europaea* L. inclui a variedade cultivada – *Olea europaea* var. *europaea* – e a selvagem – *Olea europaea* var. *sylvestris* (Kumar *et al.* 2011). Nos países mediterrânicos, as oliveiras selvagens contribuem para a beleza natural da paisagem e diferem da variedade cultivada por apresentarem um porte arbustivo, ramos espinhosos e tetragonais, assim como folhas e drupas mais reduzidas (Humphries, 2005). A var. *europaea* geralmente é cultivada para obtenção de azeite e/ou ‘azeitonas de mesa’ (Hannachi *et al.* 2017).

Existem numerosas formas da var. *europaea*, manifestando múltiplas expressões fenotípicas, vulgarmente designadas por cultivares (Leitão *et al.* 1986). Quase todas as atuais cultivares em produção resultaram de procedimentos empíricos de seleção, realizada segundo diversos critérios (Cordeiro & Inês, 2016). De entre estes, destacam-se a capacidade de adaptação aos condicionalismos regionais e locais, a qualidade do azeite e da azeitona, a resistência a determinadas pragas ou doenças, a época mais favorável de maturação da azeitona, a regularidade da produção e a produtividade (Cordeiro & Inês, 2016). Em Portugal encontram-se descritas 22 cultivares para a produção de azeite e/ou azeitonas de mesa (Fernandes, 2014). Certas cultivares estão confinadas a determinada região bem delimitada, como é o caso da cv. *Madural* na região de Trás-os-Montes (Figura 4). Outras, como a cv. *Cobrançosa*, estão representadas em mais do que uma região (Cordeiro *et al.* 2014).

#### ***Cultivar Cobrançosa***

A cv. *Cobrançosa* é uma cultivar de oliveira muito produtiva e regular, tolerante ao frio mas suscetível à secura e salinidade (Cordeiro *et al.* 2010). Apresenta um rendimento médio em azeite, sendo este medianamente rico em ácido linoleico (Cordeiro *et al.* 2013). O fruto apresenta reduzida resistência ao desprendimento da árvore e queda natural reduzida (Cordeiro *et al.* 2010). Tem a forma apical arredondada com um peso de  $\pm 4$  g e um endocarpo de 0,45-0,7 g (Cordeiro *et al.* 2010). O epicarpo é violáceo na viragem e negro quando maduro, sendo que o mesocarpo tem consistência branda e não é aderente ao endocarpo (Cordeiro *et al.* 2010). Este é médio, obovoide, de diâmetro máximo deslocado para o ápice, forma apical arredondada, forma basal aguda e superfície lisa (Figura 5.a) (Cordeiro *et al.* 2010). A cv. *Cobrançosa* apresenta incidência média às pragas da mosca-da-azeitona e cochonilha, assim como às doenças de olho-de-pavão e fumagina, apresentando uma reduzida incidência à doença da gafa (Cordeiro *et al.* 2013).

### *Cultivar Madural*

A cv. *Madural* é uma cultivar que suporta bem climas rigorosos, tanto de frio como de calor, bem como terrenos secos, sendo uma das mais raras cultivares produzidas em Portugal (Cordeiro *et al.* 2011). É uma cultivar muito produtiva, com frutificação não muito regular, mas com elevado rendimento em azeite, o qual é muito rico em ácido linoleico (Cordeiro *et al.* 2011). O fruto apresenta resistência média ao desprendimento da árvore, mas queda acentuada no final da maturação (Cordeiro *et al.* 2011). Pesa cerca de 2-4 g e o endocarpo 0,3-0,45 g (Cordeiro *et al.* 2011). A azeitona tem a forma apical pontiaguda, o epicarpo avermelhado na viragem e vermelho escuro ou negro quando maduro (Cordeiro *et al.* 2011). O mesocarpo tem consistência rija e é aderente ao endocarpo (Cordeiro *et al.* 2011). O endocarpo é de grandes dimensões, alongado ou elipsoidal, de diâmetro máximo na parte mediana, com forma apical pontiaguda e forma basal mamilar e de superfície rugosa (Figura 5.b) (Cordeiro *et al.* 2011). A cv. *Madural* apresenta uma elevada incidência às pragas da mosca-da-zeitona e cochonilha, assim como à doença de olho-de-pavão (Cordeiro *et al.* 2011). Apresenta, contudo uma média incidência à doença da gafa (Cordeiro *et al.* 2011).



**Figura 5.** Fruto e respetivo endocarpo (caroço) das cultivares *Cobrançosa* (a) e *Madural* (b). Adaptado de Cordeiro *et al.* (2010, 2011).

#### 1.4. Modos de produção e relação com o microbioma da oliveira

Nos olivais portugueses tem-se verificado uma conversão progressiva dos sistemas de cultivo de reduzida densidade – olival tradicional –, para os de elevada densidade – olival intensivo/superintensivo (Dawson, 2020). A grande diferença entre estes sistemas tem a ver com o número de árvores presentes por ha. Se no olival tradicional encontramos entre 60 a 200 árvores/ha, nas plantações intensivas este número sobe para os 285 a 415, e no superintensivo para 1600 a 2200 (Vivas, 2018). Em 2014, 80% do olival português era conduzido de forma tradicional (Reis, 2014) e atualmente apenas 37% (Dawson, 2020), predominando o olival de elevada densidade (Dawson, 2020). Contudo, a olivicultura intensiva tem sido relatada como a causa de diversos problemas ambientais na UE, principalmente da erosão do solo e

contaminação da água com fertilizantes e pesticidas (Beaufoy, 2001; Camarsa *et al.* 2010). Com a produção de reduzida densidade o impacto ambiental é menor, contudo, o olival tradicional não pode competir com o olival intensivo e superintensivo na produção de azeite a baixo custo. Sendo a sua produção realizada numa menor escala, as suas potencialidades centram-se em nichos de mercado que têm a possibilidade de valorizar a qualidade e a especificidade dos seus produtos (Reis & Coelho, 2016).

O interesse demonstrado pela opinião pública, desde o final dos anos 80, em questões ambientais e ecológicas, contribuiu para uma maior valorização do impacto ambiental das atividades humanas, nomeadamente, da agricultura (Colantoni *et al.* 2014). Na atualidade, os consumidores procuram cada vez mais alimentos obtidos de forma mais natural e com reduzido impacto ambiental (Lanfranchi *et al.* 2014). Contudo, a produção agrícola convencional tem por base um alto consumo de agroquímicos, que visa garantir e maximizar a sua viabilidade financeira, independentemente dos seus efeitos ambientais (Mzoughi, 2014). Mais recentemente, têm sido procuradas formas alternativas de cultivo da oliveira, incluindo práticas mais tradicionais. De facto, segundo Romero-Gámez *et al.* (2017), de entre os sistemas tradicionais, a produção integrada e a produção biológica são as práticas que permitem um menor impacto ambiental da produção de azeitona, sendo estas as práticas agrícolas consideradas no presente estudo. Estes modos de produção levam ao aumento da biodiversidade, à redução de pesticidas, da erosão do solo e do impacto ambiental, comparativamente à produção convencional (Mzoughi, 2014).

Em 2018, no sector da olivicultura, Portugal registou a maior área em produção biológica a nível mundial (Marques, 2018). Este é o sistema de produção mais ecológico (Pilar & Pérez, 2016), sendo que apenas fertilizantes naturais podem ser usados, juntamente com raras aplicações de inseticidas de origem natural (Benitez *et al.* 2006). Na produção convencional e integrada, os fertilizantes químicos sintéticos e inseticidas são aplicados, embora com uma taxa de aplicação de inseticidas muito menor no sistema integrado (Benitez *et al.* 2006). A produção integrada torna-se assim mais ecológica que a produção convencional e permite obter maiores rendimentos por ha do que a produção biológica (Pilar & Pérez, 2016).

A influência dos modos de produção nas propriedades bioquímicas do solo e nas características microbiológicas das culturas já foram descritas (Moreno *et al.* 2009; Sofo *et al.* 2010). Estudos recentes, em olivais, demonstraram que o modo de produção influencia a microbiologia do solo, bem como dos frutos e folhas da oliveira (Ferreira *et al.* 2013; Sofo *et al.* 2014; Pascazio *et al.* 2015; Sastre *et al.* 2016). Para além das práticas agrícolas, a colonização microbiana da planta depende de outros fatores como: genótipo, tecido vegetal, estágio de desenvolvimento, estado fisiológico e condições do solo (Hardoim *et al.* 2008; Singh *et al.* 2009). As interações entre a planta e o seu microbioma são complexas e dinâmicas, pelo que, as comunidades microbianas e sua diversidade mudam ao longo do ciclo de vida do hospedeiro

(Riesenfeld *et al.* 2004). Os microrganismos associados à planta podem viver dentro dos seus tecidos – endófitos – ou na superfície dos seus órgãos – epífitos (Lindow & Brandl, 2003). Sabe-se que os epífitos podem afetar o vigor das plantas, bem como a qualidade e a produtividade das culturas agrícolas, promovendo o seu crescimento e contribuindo para a proteção contra agentes fitopatogénicos (Whipps *et al.* 2007). Os endófitos têm sido descritos por conferirem características como: maior resistência às condições de *stresse*; alteração nas propriedades fisiológicas; produção de fitohormonas e outros compostos de interesse biotecnológico (Azevedo *et al.* 2000). Além disso, os endófitos possuem a capacidade de proteger os seus hospedeiros contra pragas de insetos e microrganismos patogénicos. Posto isto, tal como os epífitos, podem agir como agentes de biocontrolo (Hallmann *et al.* 1997; Azevedo *et al.* 2000).

### 1.5. Impacto e sintomatologia da doença da gafa em oliveira

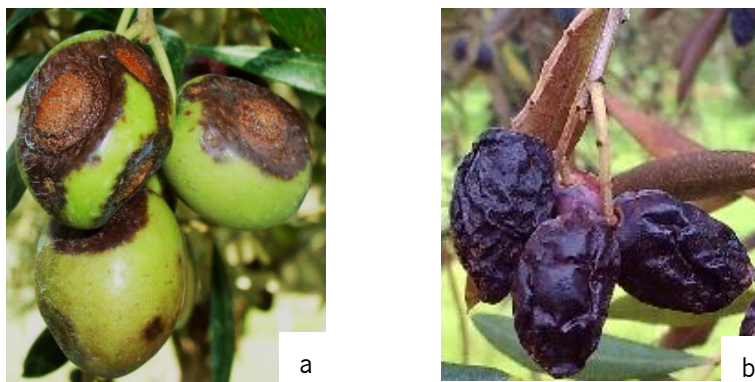
A oliveira é afetada por várias doenças, mas o principal fator fitopatológico limitante da produção de azeitona a nível nacional é a gafa (Loureiro *et al.* 2018). Em Portugal, esta doença atinge níveis epidémicos causando, por vezes, perdas totais de rendimento (Talhinhas *et al.* 2011). Os olivais infetados apresentam quebra de produção e/ou depreciação da qualidade do azeite (Moral *et al.* 2014), uma vez que neste ocorre um aumento da acidez e dos valores de peroxidase, bem como uma diminuição da estabilidade oxidativa e dos compostos fenólicos (Carvalho *et al.* 2008).

A infeção da oliveira requer a presença de água livre no fruto ou humidade relativa superior a 98%, a uma temperatura ideal de 17-20°C (Moral *et al.* 2012), sendo particularmente potenciada por condições específicas como: uso de cultivares suscetíveis e abundância de reservatórios de inóculo da doença (Talhinhas *et al.*, 2011). A gafa afeta diferentes órgãos da oliveira, incluindo flores, folhas e ramos, sendo os frutos os mais afetados (Cacciola *et al.* 2012). Assim, os sintomas característicos da doença surgem maioritariamente nos frutos, principalmente quando estão quase maduros (Cacciola *et al.* 2012). Os primeiros sintomas de azeitonas doentes são pequenas manchas escuras, necróticas, circulares no epicarpo que depois ficam profundas, levando à podridão do fruto (Materatski *et al.* 2018). Em condições húmidas, na superfície dos frutos infetados, surgem os corpos de frutificação dos fungos – acérvulos – os quais formam uma massa alaranjada de conídeos (Figura 7.a) (Sarkar, 2016). Em condições de secura, os frutos infetados desidratam, perdendo peso, e ficam mumificados (Figura 7.b) (Moral *et al.* 2014). Os frutos infetados caem prematuramente no chão e apenas alguns dos mumificados permanecem presos à árvore, estimando-se que, em média, permaneçam até ao outono seguinte (Moral & Trapero, 2012). Apesar dos frutos maduros serem mais propícios à infeção, as drupas verdes das



cultivares mais suscetíveis podem também ser infetadas (Moral *et al.* 2014). A infeção pode ocorrer em qualquer parte da azeitona, mas é mais comum no ápice uma vez que é a zona mais exposta à humidade (Cacciola *et al.* 2012)

Os outros órgãos da árvore podem também evidenciar sintomas da doença: as folhas podem apresentar ferrugem, clorose, necrose e cair (Materatski *et al.* 2018); os ramos podem morrer, principalmente os inferiores, uma vez que permanecem mais tempo húmidos (de Cantero, 1997); e as flores tendem a secar e cair (Sergeeva *et al.* 2008). Para além disso, o agente fitopatogénico pode alcançar a semente através de tecidos vasculares, causando a morte da plântula proveniente da semente infetada (Moral *et al.* 2009).



**Figura 6.** Azeitonas com sintomatologia da doença da gafa: a) acérvulos sobre o fruto b) fruto mumificado. *In:* Ulivita (2017) e Agro-Manual (2016)

## 1.6. Os agentes causais da doença da gafa em oliveira

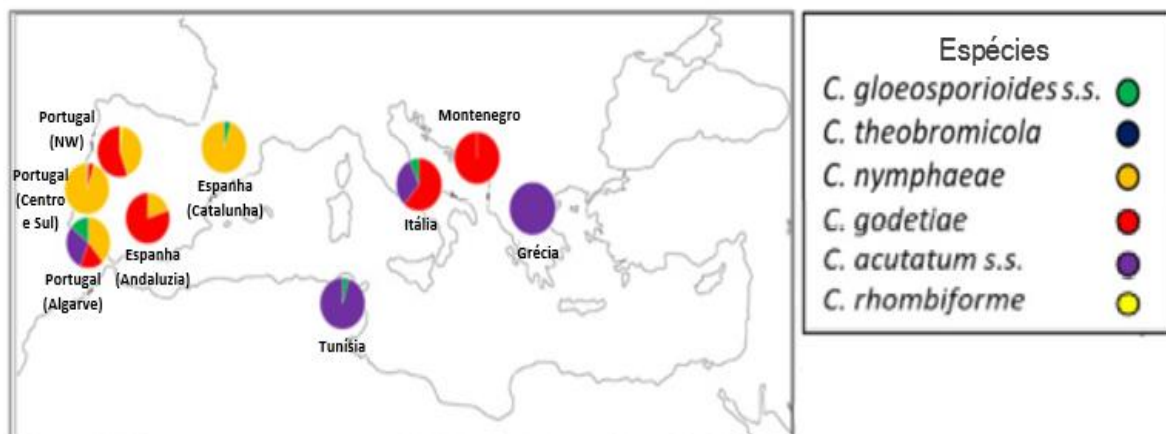
Existem registos de sintomas idênticos aos provocados pela doença da gafa no sudoeste da Península Ibérica desde o século XI (Moral *et al.* 2014). Contudo, o agente causal desta doença só foi descrito pela primeira vez em Portugal no ano de 1899, como *Gloeosporium olivarum* (Almeida, 1899), o qual foi posteriormente designado por *Colletotrichum gloeosporioides* (von Arx, 1957). Em 1999 foi demonstrada a existência de dois complexos responsáveis pela doença da gafa (Martín & García-Figueroles, 1999) – *C. acutatum sensu lato (s.l.)* e *C. gloeosporioides s.l.* – os quais compreendem um total de 13 espécies (Scheda *et al.* 2014). As análises filogenéticas revelaram que seis dessas espécies pertencem ao complexo *C. acutatum s.l.* (*C. fioriniae*, *C. simmondsii*, *C. nymphaeae*, *C. acutatum sensu stricto (s.s.)*, *C. godetiae* e *C. rhombiforme*) e duas ao complexo *C. gloeosporioides s.l.* (*C. gloeosporioides s.s.* e *C. theobromicola*) (Weir *et al.* 2012, Scheda *et al.* 2014; Mosca *et al.* 2014). De todas estas espécies, *C. acutatum s.s.*, *C. godetiae* e *C. nymphaeae* foram reconhecidas como sendo os principais agentes causadores da gafa à escala global (Mosca *et al.* 2014). Em Portugal, *C. acutatum s.l.* é o complexo maioritariamente responsável pela doença da gafa, com uma

ocorrência de 97% (Talhinhas *et al.* 2005). *C. gloeosporioides s.l.* ocorre raramente, apresentando uma incidência de 3% (Talhinhas *et al.* 2005). Dentro do complexo *C. acutatum s.l.*, *C. nymphaeae* é a espécie com maior incidência em Portugal (80%), seguida por *C. godetiae* (12%) e *C. acutatum s.s.* (3-4%). *C. fioriniae* foi esporadicamente identificada como causando a doença da gafa e *C. rhombiforme* apenas uma vez (Talhinhas *et al.* 2005, 2011). Segundo Talhinhas *et al.* (2015), das seis espécies *Colletotrichum*, identificadas em Portugal, *C. acutatum s.s.* e *C. nymphaeae* revelaram-se as mais virulentas, seguidas por *C. godetiae* e *C. fioriniae*, sendo *C. gloeosporioides s.s.* e *C. rhombiforme* as menos invasivas.

#### ***Distribuição dos complexos de Colletotrichum causadores da doença da gafa***

Depois de 1899, a doença da gafa foi rapidamente reconhecida em todos os continentes (Cacciola *et al.* 2012), sendo causada por diferentes espécies consoante a sua preferência geográfica. *C. nymphaeae* e *C. godetiae* são as espécies prevalentes no Hemisfério Norte, enquanto *C. acutatum s.s.* é a espécie mais frequente no Hemisfério Sul (Talhinhas *et al.* 2018). Apesar de relatada em todos os continentes, a doença tem maior incidência e severidade na bacia do Mediterrâneo (Talhinhas *et al.* 2018). Nessa região, a espécie *C. acutatum s.s.* parece estar a substituir *C. godetiae*, outrora a espécie predominante (Iliadi *et al.* 2018). *C. nymphaeae*, como representado na Figura 8, parece estar restrita à Península Ibérica (Talhinhas *et al.* 2018).

Em Portugal, segundo Loureiro *et al.* (2018), a incidência da gafa é de 30-50%, tendo-se verificado nos últimos anos um aumento da severidade da doença na região de Trás-os-Montes (da Silva, 2016). Nesta zona, *C. godetiae* é o agente causal da gafa mais frequente (Loureiro *et al.* 2018), apesar de também terem sido isolados *C. nymphaeae* e *C. rhombiforme* (Figura 8) (Talhinhas *et al.* 2005, 2011). No Centro e Sul do país, prevalecem *C. nymphaeae*, e na região do Algarve foram identificadas *C. gloeosporioides s.s.*, *C. nymphaeae*, *C. godetiae* e *C. acutatum s.s.* (Loureiro *et al.* 2018). *C. fioriniae* foi identificado em diferentes anos e regiões de Portugal, mas de forma esporádica (Talhinhas & Sreenivasaprasad, 2005).

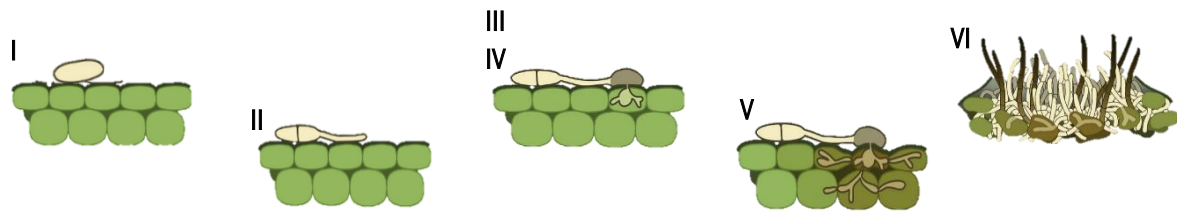


**Figura 7.** Distribuição geográfica dos registos de doença da gafa na bacia do Mediterrâneo e frequência relativa das espécies de *Colletotrichum*. Adaptado de Talhinhos *et al.* (2018)

### *Processo de infeção da oliveira*

O ciclo de vida de *Colletotrichum* spp. compreende os estágios sexuado e assexuado, sendo o último responsável pelo processo de dispersão e infeção do fungo (Gomes *et al.* 2012). A infeção envolve os seguintes processos: (I) fixação de conídios à superfície do hospedeiro; (II) germinação de conídios; (III) formação do apressório; (IV) penetração da cutícula do hospedeiro; (V) crescimento e colonização nos tecidos vegetais; e (VI) formação de acérvulos e esporulação (Figura 9) (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

Sabe-se que os conídios de *Colletotrichum* spp. são capazes de sobreviver nos frutos, folhas e ramos de oliveira (Loureiro *et al.* 2018). Segundo Talhinhos *et al.* (2011), as folhas possuem níveis mais elevados destes esporos do que os ramos. Contudo, estas servem como reservatórios do inóculo a curto prazo, enquanto os ramos servem a longo prazo (Loureiro *et al.* 2018). Isto porque, a quantidade de inóculo diminui mais acentuadamente nas folhas do que nos ramos ao longo do Verão (Loureiro *et al.* 2018). Os conídios possuem capacidade de germinar nas folhas e ramos, apesar de numa taxa mais reduzida do que nas azeitonas maduras (Talhinhos *et al.* 2011). Após a germinação, as hifas diferenciam um apressório, a partir do qual se forma uma hifa que penetra nos tecidos do hospedeiro (Talhinhos *et al.* 2011). Enquanto, em azeitonas maduras, o fungo alastra então pelos tecidos do hospedeiro (Loureiro *et al.* 2018), em azeitonas verdes, a hifa de penetração não prossegue o crescimento até ocorrer a maturação do fruto (Loureiro *et al.* 2018). Segundo Cacciola *et al.* (2012), a penetração do fungo na planta também pode ocorrer por estomas ou lenticulas, bem como através de feridas causadas por ataques de insetos como *Bactrocera oleae*. A colonização dos tecidos leva à manifestação dos sintomas da doença, como o aparecimento de lesões e formação de acérvulos (Talhinhos *et al.* 2011), capazes de gerar conídios e consequentemente infeções secundárias (Loureiro *et al.* 2018).



**Figura 8.** Processo de infecção de *Colletotrichum* spp.: (I) fixação do conídio à superfície do hospedeiro; (II) germinação do conídio; (III) formação do apressório; (IV) penetração da cutícula do hospedeiro; (V) crescimento e colonização nos tecidos vegetais; e (VI) formação de acérvulos e esporulação. Adaptado de de Silva (2017).

### 1.7. O controlo da doença da gafa da oliveira

Atualmente não existe nenhuma medida eficaz de proteção contra a doença da gafa (Martins *et al.* 2019). Contudo, existem algumas medidas que visam a sua prevenção – métodos indiretos – e proteção das culturas – métodos diretos (Cacciola *et al.* 2012; Moral *et al.* 2018). Na prevenção da doença, procuram-se reduzir os níveis de inóculo dos agentes causais e a sua disseminação (Martins *et al.* 2019). Para isso aconselha-se o uso de cultivares de oliveira resistentes, bem como o controlo de insetos disseminadores do agente patogénico, como seja a mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Martins *et al.* 2019). São ainda indicadas técnicas de cultivo que promovam a fitossanidade dos olivais, como seja a fertilização, irrigação e poda adequadas (Moral *et al.* 2014; Sergeeva, 2011). Os elevados níveis de humidade por excesso de irrigação contribuem para a infecção e dispersão de *Colletotrichum* spp. (Cacciola *et al.* 2012). A poda das árvores promove também a redução das potenciais fontes de inóculo e melhora o arejamento da copa, desfavorecendo a propagação da doença (Sergeeva, 2011). Nas áreas em que a incidência da gafa é elevada, os agricultores tendem a antecipar a colheita (Tahinhas *et al.* 2018), uma vez que a suscetibilidade da azeitona aumenta com a sua maturação (Gomes *et al.* 2012b). Contudo, esta prática tem consequências nas características do azeite, bem como no seu rendimento (Tahinhas *et al.* 2018).

A proteção dos olivais contra a doença é conseguida principalmente através da aplicação de fungicidas cúpricos, os quais devem ser aplicados aquando das primeiras chuvas outonais, antes do aparecimento dos primeiros sintomas (Loureiro *et al.* 2018). No entanto, este tratamento pode ser ineficaz, pois o produto é facilmente lixiviado pela chuva (Tahinhas *et al.* 2018). Para além da sua reduzida eficácia, à aplicação dos fungicidas cúpricos encontram-se associados problemas de ordem ambiental (Tahinhas *et al.* 2018). O uso destes fungicidas tem consequências a longo prazo, devido à sua acumulação no solo e na água (Tahinhas *et al.* 2018); também no azeite podem ser encontrados resíduos deste produto (García-Reyes *et al.* 2007). As restrições regulamentares sobre a utilização de pesticidas, juntamente com uma maior consciencialização sobre o seu impacto na saúde e no meio ambiente, têm direcionado a investigação no sentido de se desenvolverem alternativas mais ecológicas

de controlo da doença, recorrendo a produtos naturais e técnicas de biocontrolo (Loureiro *et al.* 2018). Posto isto, produtos naturais, como extratos vegetais e de origem mineral, têm vindo a ser explorados no controlo da doença da gafa (Moral *et al.* 2018). Recentemente, um extrato obtido a partir da casca da romã revelou ser eficaz contra *Colletotrichum* sp. (Pangallo *et al.* 2017). A aplicação de cálcio *in vitro* demonstrou também ser capaz de inibir a formação do apressório deste agente fitopatogénico (Xavier *et al.* 2014).

### ***Medidas de biocontrolo***

Apesar de ainda não existirem agentes eficazes de biocontrolo contra a doença da gafa, alguns autores já descreveram resultados promissores nesse sentido (Martins *et al.* 2019). A filosfera da oliveira é colonizada por uma comunidade microbiana diversa, que cresce epifiticamente (na superfície de tecidos vegetais) e endofiticamente (dentro dos tecidos da planta), habitando o mesmo nicho que *Colletotrichum* spp. (Costa *et al.* 2020; Mina *et al.* 2020; Gomes *et al.* 2018). Muitos desses microrganismos desempenham papéis cruciais na proteção das plantas contra doenças (Mina *et al.* 2020; Gomes *et al.* 2019), o que os torna potenciais agentes de biocontrolo para a doença da gafa (Martins *et al.* 2019). A identificação de microrganismos endófitos e epífitos da oliveira permitiram selecionar fungos – como *Chondrostereum purpureum*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus* spp., *Quambalaria cyanescens*, *Epicoccum nigrum*, *Chaetomium globosum*, *Alternaria* sp., *Diaporthe* sp. e *Nigrospora oryzae* – que *in vitro* mostraram atividade antagonista contra os agentes causais da doença da gafa (Landum *et al.* 2016; Preto *et al.* 2017). Alguns destes fungos inibiram o crescimento, esporulação e germinação de *Colletotrichum* spp., promovendo igualmente danos nas suas hifas (Preto *et al.* 2017). Estes efeitos de antagonismo devem-se, possivelmente, à produção de compostos antimicrobianos e enzimas líticas (Preto *et al.* 2017). Adicionalmente, em inoculações realizadas em azeitonas, o fungo endófito *Trichoderma koningii* demonstrou reduzir significativamente a incidência e a severidade da gafa, bem como a produção e germinação de esporos de *C. godetiae* (Martins *et al.* 2017). Recentemente, Nigro *et al.* (2018) mostrou que a aplicação do endófito *Aureobasidium pullulans* em olivais reduzia a severidade e infeção da gafa. Tem sido assim evidenciada a potencialidade dos endófitos e epífitos de oliveira para o controlo da doença da gafa, devendo haver um esforço na identificação e caracterização de isolados com potencial antagonista contra as diferentes espécies do complexo de *Colletotrichum*.

## 1.8. Objetivos da tese

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar as potencialidades do microbioma nativo da oliveira na luta biológica contra a doença da gafa. Especificamente, pretende-se avaliar as relações *in vitro* de microrganismos associados à oliveira (endófitos e epífitos) e agentes causais da doença da gafa, assim como caracterizar a comunidade fúngica que habita (epi- e endofiticamente) a azeitona.

O efeito antagonista contra os agentes causais de gafa (*Colletotrichum* spp.) será avaliado recorrendo a fungos endófitos, previamente isolados de folhas e ramos assintomáticos da oliveira. A capacidade de antagonismo destes fungos contra espécies *Colletotrichum*, isoladas a partir de azeitonas com sintomatologia da gafa, será avaliada recorrendo ao método de co-cultura. Utilizando uma estratégia de *metabarcoding*, em que a região ITS será utilizada como *barcode*, serão identificados fungos endófitos/epífitos de azeitonas, provenientes de dois sistemas de produção diferentes (agricultura biológica e produção integrada) e de duas cultivares com diferentes suscetibilidades à gafa (cv. *Madural* – moderadamente suscetível – e cv. *Cobrançosa* – resistente). A comunidade fúngica associada a cada cultivar será também investigada em frutos em diferentes estados de maturação (verdes e semi-maduros). As comunidades serão comparadas entre modos de produção, entre cultivares e entre estados de maturação, sendo correlacionadas com a suscetibilidade à infeção pela doença da gafa. Desta forma, é esperado avaliar o efeito da comunidade fúngica na proteção da oliveira e ainda prever as espécies com maior potencial bioprotetor. Globalmente, os resultados deste trabalho permitirão revelar as relações microrganismo-microrganismo e microrganismo-hospedeiro que podem ser relevantes para a saúde da oliveira e para projetar uma nova estratégia de controlo biológico desta doença.

## 1.9. Referências bibliográficas

Agro-Manual. 2016. Disponível em:

<https://www.facebook.com/agromanualonline/photos/a.587622094746479/660323944142960/?type=1&theater> [consultado em 12 de março de 2020].

Almeida JV. 1899. La gaffa des olives en Portugal. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 15: 90-94.

Ammar S, Contreras MDM, Gargouri B, Segura-Carretero A, Bouaziz M. 2017. RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product "wood" and its comparison with leaf counterpart. *Phytochemical Analysis* 28 :217-229

Arias-Calderón R, Carvalho MT, Cordeiro A. 2017. A importância dos progenitores no programa de melhoramento da oliveira por hibridação. INIAV, I.P.

- Azevedo JL, Maccheroni W Jr, Pereira JO. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB Elect J Biotechnol.* 3:40–65.
- Beaufoy G. 2001. EU policies for olive farming: Unsustainable on all counts.
- Benitez E, Nogales R, Campos M, Ruano F. 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32: 221-231.
- Bianchi G. 2003. Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105: 229-242.
- Bonvino NP, Liang J, McCord ED, Zafiris E, Benetti N, Ray NB, Hung A, Boskou D, Karagiannis TC. 2018. OliveNetTM: a comprehensive library of compounds from *Olea europaea*. *Database* 1-9.
- Bracci T, Busconi M, Fogher C, Sebastiani L. 2011. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): Overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports* 30: 449-462.
- Cacciola S, Faedda O, Sinatra R, Agosteo F, Schena G, Frisullo L, di San SM, Lio G. 2012. Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 94: 29-44.
- Camarsa G, Gardner S, Jones W, Eldridge J, Hudson T, Thorpe E, O'Hara E. 2010. LIFE among the olives: Good practice guide in improving environmental performance in the olive oil sector. European Union: Luxemburg.
- Carvalho MT, Simões-Lopes P, Silva MJM. 2008. Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* on some important olive oil chemical parameters. *Acta Horticulturae* 791: 555-559.
- Charoenprasert S, Mitchell A. 2012. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 7081- 7095.
- Coelho V. 2016. Integração de diferentes meios de protecção contra a mosca da azeitona, *Bactrocera Oleae* (Rossi) em agricultura sustentável. Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Colantoni A, Monarca D, Cecchini M. 2014. Special issue renewable energy, biomass and biological residues. *Applied Mathematical Sciences* 8:129-132.
- Cordeiro AM, Calado ML, Morais N, Miranda A, Carvalho MT. 2010. Cultivares de oliveira: Cobrançosa. *Vida Rural*.
- Cordeiro AM, Calado ML, Morais N, Miranda A, Carvalho MT. 2011. Variedades de oliveira: Madural. *Vida Rural*.
- Cordeiro AM, Santos MLC, Morais NC. 2013. As Variedades de Oliveira. O grande livro da oliveira e do azeite: Portugal oleícola. Lisboa: Dinalivro
- Cordeiro AM., Inês C, Morais N. 2014. Principais cultivares de oliveira existentes em Portugal. Boas práticas no olival e no lagar. INIAV IP.
- Cordeiro AM, Inês C. 2016. Recursos genéticos da oliveira e a sua preservação no contexto das alterações climáticas. *Vida Rural* 30-32.

- Cordeiro AM, Calderón RA, Ines CSF. 2019. Episódios climáticos que mais condicionam a produtividade do olival. *Vida Rural* 32–35.
- Costa D, Fernandes T, Martins F, Pereira JA, Tavares RM, Santos PM, Baptista P, Lino-Neto T. 2020. Illuminating *Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research* 245: 126693
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.
- Cuevas J, Polito VS. 2004. The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea Europaea* (Oleaceae): An andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Annals of Botany* 93: 547-553.
- D'Angeli S, Malhó R, Altamura MM. 2003. Low-temperature sensing in olive tree: Calcium signalling and cold acclimation. *Plant Science* 165: 1303-1313.
- da Silva VCF. 2016. Olive anthracnose: passive defense of tolerant and susceptible Portuguese *Olea europaea* L. cultivars and its effect on olive oil quality. Tese de Mestrado, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.
- de Cantero FA. 1997. Enfermedades y plagas del olivo. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
- de Silva DD, Crous PW, Ades PK, Hyde KD, Taylor PWJ. 2017. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews* 31: 155-168.
- Direção-Geral do Território, 2018. Carta de Uso e Ocupação do Solo de Portugal Continental (COS). Relatório Técnico. Disponível em [http://www.dgterritorio.pt/dados\\_abertos/cos/](http://www.dgterritorio.pt/dados_abertos/cos/) [consultado em 10 de março de 2020].
- FAO (Food and Agriculture Association). FAOSTAT. 2018. Acessível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [consultado em 12 de março de 2020].
- FAO (Food and Agriculture Association). FAOSTAT. 2019. Acessível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [consultado em 6 de março de 2020].
- Fernandes G. 2014. caracterização morfológica e genética de cultivares de oliveiras centenárias e tradicionais para a obtenção de produtos diferenciados. Tese de Mestrado, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.
- Ferreira IQ, Arrobas M, Claro AM, Rodrigues MA. 2013. Soil management in rainfed olive orchards may result in conflicting effects on olive production and soil fertility. *Span J Agric Res.* 11:472–480.
- Galili E, Stanely JD, Sharvit J, Wienstein-Evron M. 1997. Evidence for earliest olive oil production in submerged settlements off the Carmel Coast. *Journal of Archaeological Science* 24: 1141-1150.
- Galili E, Weinstein-Evron M, Zohary D. 1989. Appearance of olives in submerged Neolithic sites along the Carmel Coast. *Journal of the Israel Prehistoric Society.* 22: 95-97.
- García-Reyes JF, Ferrer C, Gómez-Ramos MJ, Fernández-Alba AR, Molina-Díaz A. 2007. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry* 26: 239-251.
- Gomes S, Prieto P, Carvalho T, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P. 2012 . Olive- *Colletotrichum acutatum*. An example of fruit-fungal interaction in Abdurakhmonov.
- Gomes S, Bacelar E, Martins-Lopes P, Carvalho T, Guedes-Pinto H. 2012 b. Infection process of olive fruits by *Colletotrichum acutatum* and the protective role of the cuticle and epidermis. *Journal of Agricultural Science* 4: 101-110.



- Gomes T, Pereira JA, Lino-Neto T, Bennett AE, Baptista P. 2019. Bacterial disease induced changes in fungal communities of olive tree twigs depend on host genotype. *Scientific Reports* 9: 5882.
- Gomes T, Pereira JA, Benhadi J, Lino-Neto T, Baptista P. 2018. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungal communities are shaped by different environmental factors in a Mediterranean ecosystem. *Microbial Ecology* 76: 668-679.
- Guerra D, Lamontanara A, Bagnaresi P, Orrù L, Rizza F, Zelasco S, Beghè D. 2015. Transcriptome changes associated with cold acclimation in leaves of olive tree (*Olea Europaea* L.). *Tree Genetics & Genomes* 11:113
- Haifa Group. 2014. Nutritional recommendation for olives. Haifa: Haifa Chemicals Ltd.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian J Microbiol.* 10:895–914.
- Hammami SBM, Manrique T, Rapoport HF. 2011. Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Scientia Horticulturae* 130: 445-451.
- Hannachi H, Gómez JJM, Saadaoui E, Cervantes E. 2017. Stone Diversity in Wild and Cultivated Olive Trees (*Olea Europaea* L.) *Dendrobiology* 77: 19–32.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16:463–471.
- Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S. 2015. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015: 541591.
- Humphries CJ. Guia de Campo das Árvores de Portugal e Europa. Fapas.
- Iliadi MK, Tjamos E, Antoniou P, Tsitsigiannis DI. 2018. First report of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on olives in Greece. *Plant Disease* 102: 820-824.
- INE (Instituto Nacional de Estatística). 2020. Previsões Agrícolas. Acessível em [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_destaques&DESTAQUESdest\\_boui=399589801&DESTAQUESmodo=2&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=399589801&DESTAQUESmodo=2&xlang=pt) [consultado em 6 de março de 2020].
- IOC (International Olive Council). 2016. Olive Oil Market. Acessível em <https://www.oliveoilmarket.eu/trends-in-world-olive-oil-consumption/> [consultado em 6 de março de 2020].
- IOC (International Olive Council). 2018. Olioofficina. Acessível em <http://www.olioofficina.net/knowledge/olives/world-table-olive-market.htm> [consultado em 6 de março de 2020].
- Kaniewski D, van Campo E, Boiy T, Terral JF, Khadari B, Besnard G. 2012. Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: Palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews* 87: 888-899.
- Koubouris GC, Metzidakis JT, Vasilakakis MD. 2009. Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environmental and Experimental Botany* 67: 209-214.

- Kumar S, Kahlon T, Chaudhary S. 2011. A rapid screening for adulterants in olive oil using DNA barcodes. *Food Chemistry* 127: 1335-1341.
- Landum MC, Félix MR, Alho J, Garcia R, Cabrita MJ, Rei F, Varanda C. 2016. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological Research* 183:100-108.
- Lanfranchi M, Giannetto C, De Pascale A. 2014. Nature based tourism: Natural balance, impacts and management. *Quality–Access Success* 15: 224-229.
- Lanza B, Serio MG. 2015. SEM Characterization of olive (*Olea Europaea* L.) fruit epicuticular waxes and epicarp. *Scientia Horticulturae* 191: 49-56.
- Leitão F, Potes MF, Calado ML, Almeida FJ. 1986. Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Direção Geral de Planeamento e Agricultura, Lisboa.
- Lindow SL, Brandl MT. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875-1883.
- Loureiro A, Talhinhos P, Oliveira H. 2018. A gafa da oliveira é causada por fungos de diversas espécies, com distinta distribuição geográfica, virulência e preferência pela cultivar. *Revista de Ciências Agrárias* 41: 141-50.
- Makowska-Wąs J, Galanty A, Gdula-Argasińska J, Tyszka-Czochara M, Szewczyk A, Nunes R, Carvalho IS, Michalik M, Paśko P. 2017. Identification of predominant phytochemical compounds and cytotoxic activity of wild olive leaves (*Olea europaea* L. ssp. *sylvestris*) harvested in South Portugal. *Chemistry and Biodiversity* 14: 1-10.
- Maldonado NG, López MJ, Caudullo G, de Rigo D. 2016. *Olea Europaea* in Europe: Distribution, Habitat, Usage and Threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*.
- Malheiro R. 2015. Olive Fruit Fly (*Bactrocera Oleae* Rossi) - Olive tree interactions: Study of physical and chemical aspects. Tese de Douturamento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.
- Marchese A, Marra FP, Caruso T, Mhelembe K, Costa F, Fretto S, Sargent DG. 2016. The first high-density sequence characterized SNP-based linkage map of olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) developed using genotyping by sequencing. *Australian Journal of Crop Science* 10: 857–63.
- Marques A. 2018. Análise técnico-financeira de um olival em dois modos de produção diferentes: Biológico e Convencional. Instituto Superior de Contabilidade e Administração de Coimbra. Instituto Politécnico de Coimbra.
- Martin MP, Garcia-Figueres F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology* 105: 733-741.
- Martins F, Pereira JA, Bota P, Bento A, Baptista P. 2017. Interaction between *Colletotrichum godetiae* and *Trichoderma koningii* and their effect on incidence and severity of olive anthracnose. COST FA1405 annual meeting –“systems biology approaches to identify mechanisms underlying crop-arthropod-microbe interactions”. Eslovénia.
- Martins F, Pereira JA, Baptista P. Olive anthracnose and its management by fungal endophytes: An overview. 2019. *Plant Microbe Interface* 253-269.
- Materatski P, Varanda C, Carvalho T, Dias AB, Campos MD, Rei F, Félix MR. 2018. Diversity of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose and new perspectives on controlling the disease in Portugal. *Agronomy* 8: 301.

- Mina D, Pereira JA, Lino-Neto T, Baptista P. 2020. Epiphytic and endophytic bacteria on olive tree phyllosphere: exploring tissue and cultivar effect. *Microbial Ecology* 80:145–157.
- Moral J, Trapero A. 2009. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. 93: 1028-1036.
- Moral J, Trapero A. 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102: 982-989.
- Moral J, Xavier C, Roca LF, Romero J, Moreda W, Trapero A. 2014. La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites* 65:e028.
- Moral J, Agusti-Brisach C, Agalliub G, de Oliveira R, Pérez-Rodríguez M, Roca LF, Romero J, Trapero A. 2018. Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. *Crop Protection* 114:167-176.
- Moreno B, Garcia-Rodriguez S, Canizares R, Castro J, Benitez E. 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agri Ecosyst Environ*. 131:333–339.
- Mosca S, Li Destri Nicosia MG, Cacciola SO, Schena L. 2014. Molecular analysis of *Colletotrichum* species in the carposphere and phyllosphere of olive. *PLoS One* 9: e114031.
- Muñoz-Rojas J, Pinto-Correia T. 2018. Portugal: National Report SUFISA. ICAAM, Universidade de Évora.
- Mzoughi N. 2014. Do organic farmers feel happier than conventional ones? An exploratory analysis. *Ecological Economics* 103: 38-43.
- Naghiloo S, Dadpour MR, Gohari G, Endress PK. 2013. Comparative study of inflorescence development in Oleaceae. *American Journal of Botany* 100: 647-663.
- Nasir E. 1982. Flora of West Pakistan. Pakistan Agricultural Research Council
- Niaounakis M, Halvadakis CP. 2006. Olive processing waste management.
- Nigro F, Antelmi I, Labarile R, Sion V, Pentimone I. 2018. Biological control of olive anthracnose. *Acta Hort* 1199. In: Perica S et al (eds) Proceedings of VIII international olive symposium
- Olive Oil Source. Disponível em: <https://www.oliveoilsource.com/PAGE/OLIVE-CLASSIFICATION> [consultado em 10 de março de 2020].
- Özcan M, Matthäus B. 2017. A review : benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology* 243: 89-99.
- Pangallo S, Nicosia MGLD, Agosteo GE, Abdelfattah A, Romeo FV, Cacciola SO, Rapisarda P, Schena L. 2017. Evaluation of a pomegranate peel extract as an alternative means to control olive anthracnose. *Phytopathology* 107: 1462-1467.
- Pascazio S, Crecchio C, Ricciuti P, Palese AM, Xiloyannis C, Sofo A. 2015. Phyllosphere and carposphere bacterial communities in olive plants subjected to different cultural practices. *Int J Plant Biol*. 6:15–19.
- Pilar E, Pérez LP. 2016. Sustainability and multifunctionality of protected designations of origin of olive oil in Spain. *Land Use Policy* 58: 264-75.

- Porfírio S, Calado LM, Noceda C, Cabrita MJ, Silva MG, Azadi P, Peixe A. 2016. Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 204: 41-53.
- Preto G, Martins F, Pereira JA, Baptista P. 2017. Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. *Biological Control* 110: 1-9.
- Reis P. 2014. O olival em Portugal: Dinâmicas, tecnologias e relação com o desenvolvimento rural, Animar - Associação Portuguesa para o Desenvolvimento Local, Lisboa.
- Reis P, Coelho IS. 2016. Olivais Tradicionais – Espaços Multifuncionais, 36–37.
- Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet.* 38:525–552.
- Romero-Gámez M, Castro-Rodríguez J, Suárez-Rey EM. 2017. Optimization of olive growing practices in Spain from a life cycle assessment perspective. *Journal of Cleaner Production* 149: 25-37.
- Rugini E, Cristofori V, Silvestri C. 2016. Genetic improvement of Olive (*Olea Europaea* L.) by conventional and *in vitro* biotechnology methods. *Biotechnology Advances* 34: 687-696.
- Sarkar AK. 2016. Anthracnose diseases of some common medicinally important fruit plants. *Journal of Medicinal Plants Studies* 4: 233-236.
- Sarwar M. 2013. The theatrical usefulness of *Olea europaea* L.(Oleaceae family) nutrition in human health: A review. *Sky Journal Of Medicinal Plant Research* 2: 1-4.
- Sastre B, Pérez-Jiménez MA, Bienes R, García-Díaz A, de Lorenzo C. 2016. The effect of soil management on olive yield and VOO quality in a rainfed olive grove of Central Spain. *Hindawi Publishing Corporation. J Chem.* 2016:15.
- Sauer JD. 1993. Historical Geography of Crop Plants. CRC Press.
- Schena L, Mosca S, Cacciola SO, Faedda R, Sanzani SM, Agosteo GE, Sergeeva V, Magnano di San Lio G. 2014. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology* 63:437-446.
- Sebastiani L, Busconi M. 2017. Recent developments in olive (*Olea europaea* L.) genetics and genomics: Applications in taxonomy, varietal identification, traceability and breeding. *Plant Cell Reports* 36: 1345-1360.
- Sergeeva V, Spooner-Hart R, Nair N. 2008. Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Australasian Plant Disease Notes* 3:81-82.
- Sergeeva V, Spooner-Hart R. 2010. Anthracnose and queensland fruit fly in olives. *The Olive Press* 16: 23-24.
- Sergeeva, V. 2011. Anthracnose in olives: symptoms, disease cycle and management. *In: 4th International Conference for Olive Tree and Olive Products – OLIVE- BIOTEQ* (Chartzoulakis, Kostas S. ed), pp. 269–274. Chania, Greece: NAGREF Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania

- Singh G, Singh N, Marwaha TS. 2009. Crop genotype and a novel symbiotic fungus influences the root endophytic colonization potential of plant growth promoting rhizobacteria. *Physiol Mol Biol Plants*. 15:87–92.
- Sofo A, Ciarfaglia A, Scopa A, Camele I, Curci M, Crecchio C, Xiloyannis C, Palese AM. 2014. Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use Manage*. 30:160–167.
- Sofo A, Palese AM, Casacchia T, Celano G, Ricciuti P, Curci M, Crecchio C, Xiloyannis C. 2010. Genetic, functional, and metabolic responses of soil microbiota in a sustainable olive orchard. *Soil Sci*. 175:81–88.
- Sulaiman GM, Tawfeeq AT, Jaaffer MD. 2017. Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using *Olea europaea* leaf extract and evaluation of their toxicity activities: an *in vivo* and *in vitro* study. *Biotechnology Progress* 34: 218-230.
- Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2987-2998.
- Talhinhas P, Mota-Capitão C, Martins S, Ramos AP, Neves- Martins J, Guerra-Guimarães L, Várzea V, Silva MC, Sreenivasaprasad S, Oliveira H. 2011. Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* 60: 483-495.
- Talhinhas P, Gonçalves E, Sreenivasaprasad S, Oliveira H. 2015. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 142:73-83.
- Talhinhas P, Loureiro A, Oliveira H. 2018. Olive anthracnose: A yield- and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular Plant Pathology* 19:1797-1180.
- Ulivita. 2017. Disponível em: <https://www.ulivita.it/anthracnose-olives-and-integrated-disease-management-5/> [consultado em 3 de abril de 2020].
- Vivas, Paulo. 2018. Comportamento fenológico e produtivo de cinco variedades de oliveira portuguesas na região de Elvas. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária de Elvas. Instituto Politecnico de Portalegre.
- von Arx, J.A. 1970. A revision of the fungi classified as Gloeosporium. *Edited by* J. Cramer.
- Vossen P. 2007. Olive oil: History, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience* 42: 1093-1100.
- Weir B, Johnston PR, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.
- Wharton PS, Diéguez-Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.

Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD. 2007. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol.* 105:1744–1755.

Xavier CJ, Moral J, Perez M, Agalliu G, Alcantara E, Trapero A. 2014. El calcio como herramienta para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. *In:* Libro de resúmenes del XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Lleida, Spain, p. 314.

## 2. Interações *Penicillium* spp./ *Colletotrichum* spp. *in vitro*



## 2.1. Introdução

A filosfera da oliveira é colonizada por uma comunidade microbiana diversa, que cresce epi- e endofiticamente (Costa *et al.* 2020; Mina *et al.* 2020; Gomes *et al.* 2018) interagindo com agentes fitopatogénicos (Mina *et al.* 2020; Gomes *et al.* 2019). Contudo, até ao presente, a influência dos endófitos no desenvolvimento de doenças está melhor descrita do que a influência dos epífitos (Lacava *et al.* 2014). Sabe-se que os endófitos, para além de antagonizarem (Freeman & Rodriguez, 1993), podem facilitar (Arnold *et al.* 2003) ou não ter qualquer efeito sobre os agentes fitopatogénicos (Kurose *et al.* 2012). Não obstante, tem-se verificado uma maior tendência para o estudo de relações de antagonismo, do que de facilitação ou de interações neutras, uma vez que existe um crescente apelo ao desenvolvimento de estratégias de biocontrolo (Busby *et al.* 2016).

As comunidades epí- e endofítica incluem bactérias, arqueobactérias, fungos e protistas (Hardoim *et al.* 2015). No entanto, a maioria das pesquisas até ao momento concentraram-se sobretudo em bactérias, sendo que, só mais tardiamente, se demonstrou a relevância ecológica das comunidades fúngicas não-micorrizicas (Bonfante & Desirò, 2017). Os fungos podem combater os agentes fitopatogénicos diretamente – através de micoparasitismo, antibiose ou competição por recursos – ou indiretamente – pela indução de defesas das plantas (Lacava *et al.* 2014). Geralmente, vários destes mecanismos ocorrem simultaneamente (Lacava *et al.* 2014). O combate direto, como a parasitação do agente fitopatogénico pelo endófito – micoparasitismo – consiste no crescimento do endófito na direção do agente fitopatogénico, no reconhecimento e adesão de ambos os fungos e, por fim, na degradação da parede celular do agente fitopatogénico e sua penetração (Gao *et al.* 2010; Ownley *et al.* 2010). A antibiose corresponde à produção de antibióticos, compostos orgânicos voláteis bioativos e enzimas (Boddy, 2000; Woodward & Boddy, 2008), que pode ocorrer à distância e/ou após o contacto micelial (Gao *et al.* 2010 e Ownley *et al.* 2010). A competição territorial pode-se manifestar: em substituição – quando uma espécie ocupa o território da outra – ou *deadlock* – quando nenhuma espécie consegue progredir (Boddy, 2000). Durante estes diversos tipos de interação antagonista entre fungos, ocorrem variadas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, influenciadas pelas espécies presentes e condições ambientais (Griffith *et al.* 1994; Boddy, 2000). Estas alterações incluem: divisão celular rápida, ramificação e/ou agregação de hifas, crescimento aéreo, autólise e produção de pigmentos (Griffith *et al.* 1994; Boddy, 2000). Em contraste, a indução de defesas da planta mediada por fungos deriva da capacidade destes microrganismos desencadearem respostas bioquímicas e moleculares nos tecidos vegetais, que conduzem a um estado de resistência, expresso sistemicamente, tornando o hospedeiro menos suscetível a infeções subseqüentes (Lacava *et al.* 2014).



Os fungos dos géneros *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Chaetomium* e *Bionectria* são vulgarmente relatados como antagonistas de agentes fitopatogénicos (Busby *et al.* 2016). No entanto, existem grupos taxonómicos como *Fusarium* e *Penicillium* que incluem, para além de antagonistas, facilitadores e agentes fitopatogénicos (Rodríguez *et al.* 2015; Rodríguez-Estrada *et al.* 2012). O reconhecimento do papel dos fungos na proteção das culturas sugere que a incorporação estratégica, de determinadas espécies antagonistas no microbioma da planta, poderá funcionar como biocontrolo de determinadas fitopatologias (Schulz *et al.* 2015). Posto isto, para a otimização de uma estratégia de biocontrolo eficaz é importante compreender os mecanismos de interação entre os fungos nativos da planta e os seus agentes fitopatogénicos (Shehata *et al.* 2016). A triagem de potenciais antagonistas de agentes fitopatogénicos é normalmente realizada usando o ensaio de cultura dupla *in vitro*, uma vez que este método demonstrou prever as interações que ocorrem na planta (Shehata *et al.* 2016). O agente fitopatogénico e os potenciais antagonistas são cultivados, segundo o método de oposição direta, e é testada a influência da co-cultura no crescimento do agente fitopatogénico (Pliego *et al.* 2011; Bosmans *et al.* 2016).

Neste capítulo, é feita a avaliação da capacidade inibitória de *Penicillium* spp. contra *Colletotrichum* spp.. Estes fungos foram previamente isolados de *Olea europaea* L., no Instituto Politécnico de Bragança onde *Penicillium* spp. demonstrou uma promissora capacidade inibitória de *Colletotrichum* spp. (Martins, 2020). Os isolados *Penicillium* foram obtidos de folhas e ramos de oliveiras aparentemente sãs, e os fungos *Colletotrichum* de azeitonas que apresentavam sintomatologia da doença da gafa. Os ensaios de antagonismo, realizados no presente trabalho, foram realizados em co-cultura *in vitro*, segundo o método da oposição direta. As inoculações consistiram em inóculos simples – inoculação de um isolado –, ou inóculos complexos – inoculação de dois/três isolados.

## 2.2. Material e métodos

### *Material biológico*

Os isolados fúngicos utilizados nas interações *in vitro* foram previamente obtidos de *Olea europaea* L., no Instituto Politécnico de Bragança (Martins, 2020). Três dos isolados (IPB-P1 a IPB-P3) são fungos endófitos de folhas e ramos de oliveiras aparentemente sãs (tendo sido previamente descritos como *Penicillium* spp.). Outros quatro (IPB-C1 a IPB-C4) são fungos endófitos isolados de azeitonas, que apresentavam sintomatologia da doença da gafa (tendo sido previamente descritos como *Colletotrichum* spp.).

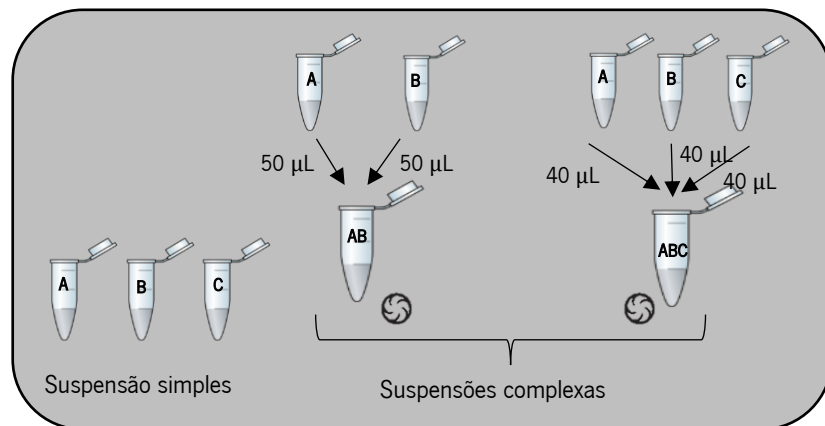
### ***Identificação molecular dos isolados***

Para confirmar molecularmente a identificação dos sete isolados, os fungos foram cultivados durante sete dias em meio Potato Dextrose Agar (Liofilchem, Italy), a 23 °C, no escuro. O DNA genómico foi extraído a partir de 100 mg de micélio, recorrendo ao *Fungal/Bacterial Miniprep Kit* (Zymo Research, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A região utilizada como *barcode* [espaçador transcrito interno (ITS), compreendendo as regiões *ITS1*, *5.8S* e *ITS2*, presente no DNA ribossomal nuclear (rDNA)] foi amplificada por reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando os *primers* universais *ITS1-F* e *ITS4*. As reações de amplificação decorreram num volume total de 10 µL, contendo: 0,5 µL de cada primer a 10 mM, 5 µL *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYtech, Portugal); 3 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA. Foi também preparado o controlo negativo, sem DNA, a fim de excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes. As reações de PCR foram efetuadas utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial – 5 min a 94 °C; 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C e 1 min a 72 °C; alongamento final – 10 min a 72 °C. Para confirmar a amplificação da região ITS foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Os produtos de PCR foram purificados com isopropanol a 75% (v/v) e enviados para o provedor de serviços de sequenciação (Stab Vida, Portugal), onde foram sequenciados usando o primer *ITS1F*. As sequências obtidas foram editadas com o *software Geneious Prime* e comparadas (BLASTN) com as sequências presentes na base de dados UNITE (<https://unite.ut.ee/>) para identificação das respetivas ASVs (amplicon sequence variant). As sequências do banco de dados que apresentaram o valor de *e* mais reduzido (idealmente próximo de 0) e a maior percentagem de semelhança com as sequências desconhecidas foram escolhidas para revelar a identidade de cada fungo.

### ***Preparação das suspensões de esporos (inóculos)***

Para a produção de esporos, os fungos foram cultivados durante sete dias em meio PDA (Liofilchem, Italy), a 23 °C, no escuro. Após sete dias de incubação, efetuou-se uma suspensão de esporos de cada isolado. As suspensões foram preparadas retirando, com um palito, uma porção de agar com micélio e transferindo-a para 1,5 mL de solução de água peptonada (10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, pH 7,2), contendo Tween 20 (0,05%; v/v). A suspensão foi vortexada e o micélio foi retirado com um palito. A concentração de cada suspensão foi ajustada para 10<sup>6</sup> esporos/mL, efetuando-se a contagem de esporos ao microscópio ótico, com o auxílio de um hemocitómetro. A forma e dimensão dos esporos de cada isolado foi igualmente registada. Ajustadas as concentrações das suspensões para 10<sup>6</sup> esporos/mL, foram preparadas suspensões complexas (contendo esporos provenientes de mais de

um isolado), adicionando duas ou três suspensões simples, nas proporções 1:1 ou 1:1:1, respetivamente (Figura 9).



**Figura 9.** Preparação de suspensões de esporos complexas a partir de suspensões simples (A, B, e C) com esporos de um isolado. Suspensão complexa AB: adição de duas suspensões simples A e B (1:1) de fungos. Suspensão complexa ABC: adição de três suspensões simples A, B e C (1:1:1) de fungos.

#### ***Avaliação da taxa de crescimento dos fungos***

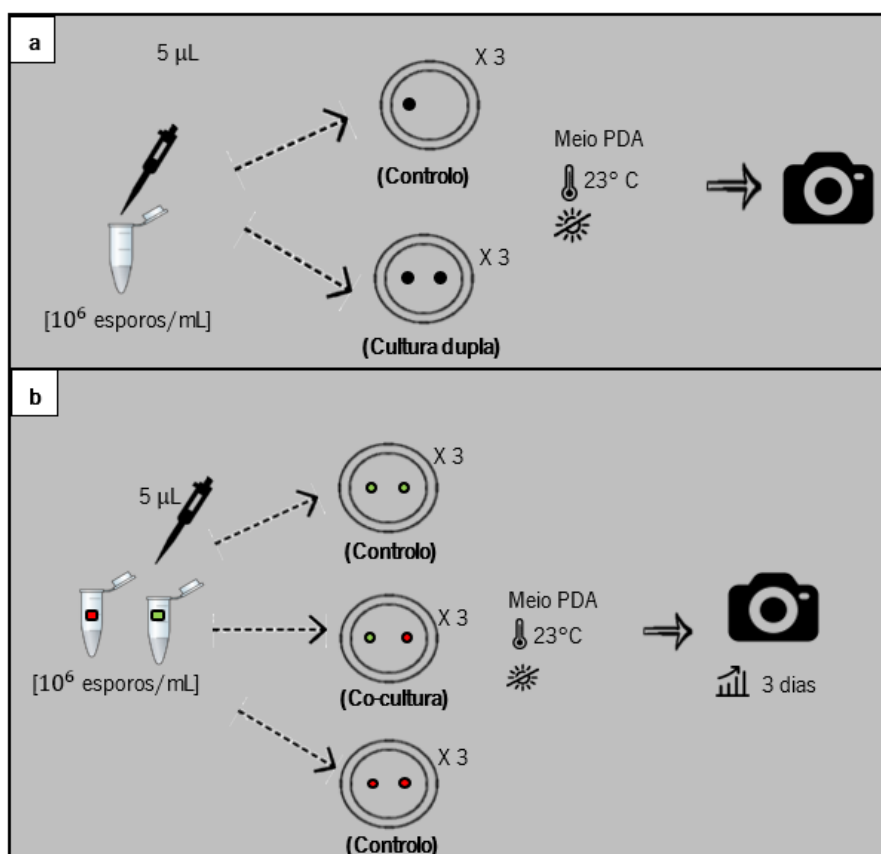
Cada suspensão simples (5 µL) foi inoculada no centro de três placas de Petri com meio PDA. Após sete dias de incubação a 23 °C, no escuro, o valor médio do crescimento micelial radial foi determinado para cada isolado.

#### ***Interações intraespecíficas à distância***

De modo a compreender as relações intraespecíficas dos isolados, efetuaram-se culturas duplas de esporos provenientes de um único isolado em meio PDA (placa de Petri de 8,6 cm de diâmetro). Os inóculos consistiram em 5 µL da suspensão de esporos a  $10^6$  esporos/mL do respetivo fungo, deixando uma distância de 4,2 cm entre os dois inóculos. A situação controlo consistiu em apenas um inóculo a 2,1 cm da margem da placa de Petri. As culturas duplas e os testes controlo foram preparados em triplicado, incubados a 23 °C, no escuro, e fotografados diariamente (Figura 10.a). As culturas duplas e respetivos controlos foram fotografados até ao último dia em que não se verificou contacto micelial nas situações de cultura dupla, correspondendo ao 3º dia (para *Fusarium* sp.), ao 4º dia (para *Colletotrichum acutatum*), 5º dia (*C. nymphaeae* e *C. fiorinae*) e 9º dia (para *Penicillium* spp.). Todas as fotografias foram processadas no *software ImageJ*, de modo a determinar as áreas das colónias fúngicas, as quais foram comparadas entre as culturas duplas e situações controlo por aplicação do teste *t* de Student, com nível de significância de 5%, no *software GraphPad*.

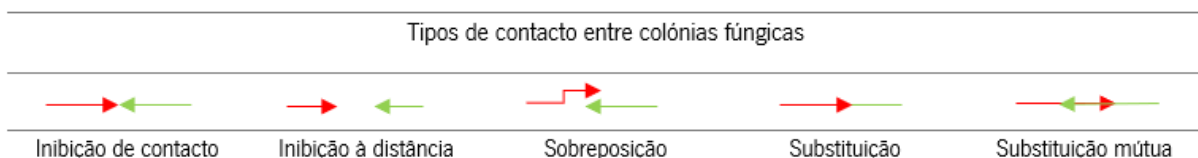
### Interações entre *Penicillium* spp. e *Colletotrichum* spp.

As interações à distância entre isolados de *Penicillium* spp. e de *Colletotrichum* spp. foram avaliadas em ensaios de co-cultura em meio PDA, com inóculos de 5 µL das respectivas suspensões de esporos. As situações controlo consistiram na cultura dupla do mesmo fungo. Deste modo, para cada interação foram estabelecidas: três réplicas com a interação *Penicillium* spp./ *Colletotrichum* spp., três com *Penicillium* spp./ *Penicillium* spp. e três com *Colletotrichum* spp./ *Colletotrichum* spp., resultando num total de nove placas por interação. Tanto nas co-culturas como nas situações controlo deixou-se uma distância de 4,2 cm entre os inóculos. Todas as placas foram incubadas a 23 °C, por 15 dias, no escuro, e fotografadas diariamente até ao terceiro dia após inoculação (Figura 10.b).



**Figura 10. a.** Preparação das interações fúngicas intraespecíficas: foram utilizados inóculos de 5 µl de suspensões de fungos [ $10^6$  esporos/mL] para preparar culturas duplas e os respetivos controlo (em triplicado); todas as culturas foram fotografadas diariamente até contato micelial. **b.** Preparação de interações de *Penicillium* spp./ *Colletotrichum* spp.: para cada interação foram estabelecidas três réplicas de *Penicillium* spp./ *Colletotrichum* spp., três controlos *Penicillium* spp./ *Penicillium* spp. e três controlos de *Colletotrichum* spp./ *Colletotrichum* spp. Cada inóculo correspondeu a 5 µL de suspensão de esporos do respetivo fungo [ $10^6$  esporos/mL]. Todas as culturas foram fotografadas diariamente, nos três dias seguintes à inoculação.

Até ao terceiro dia após as inoculações (dia em que ainda não há contacto dos micélios em qualquer interação), foram determinadas diariamente as áreas dos fungos, recorrendo ao processamento das fotografias no programa *ImageJ*. O Índice de Velocidade de Crescimento Microbiano (IVCM) dos fungos (*Penicillium* spp. e *Colletotrichum* spp.), na situação de co-cultura e na situação controlo, foi determinado recorrendo à fórmula  $IVCM = \frac{\sum(A - Aa)}{N}$ , em que: 'A' é a área do fungo no dia x, 'Aa' é a área do fungo no dia x-1 e 'N' o número de dias considerados (3). Dez dias após o estabelecimento das interações, as hifas de *Colletotrichum* spp. foram observadas com um microscópio estéreo automatizado Leica S9 D (Leica Microsystems, Germany), acoplado a uma câmara digital Leica MC170 HD (Leica Microsystems, Germany). As observações tiveram em consideração as interações em que *Colletotrichum* spp. foi inibido à distância e por contacto na presença do isolados de *Penicillium*. Após 15 dias de interação entre *Penicillium* spp. e *Colletotrichum* spp., as culturas foram observadas e classificadas quanto ao tipo de contacto entre as colónias, de acordo com as categorias definidas por Boddy (2000): inibição de contacto, quando o crescimento das duas colónias é interrompido na linha de contacto (não é formada uma zona de inibição); inibição à distância, quando é formada uma zona de inibição; sobreposição, quando ocorre o crescimento de uma colónia sobre a outra; substituição, quando o micélio de um fungo é substituído pelo do oponente; e substituição mútua, onde ambos os fungos ganham território do outro (Figura 11).



**Figura 11.** Classificação das interações entre fungos, de acordo com as categorias definidas por Boddy (2000).

## 2.3. Resultados e discussão

### *Identificação dos isolados de oliveira*



A identificação molecular dos isolados, previamente obtidos dos ramos e folhas de oliveiras sãs e de azeitonas com sintomas de gafa, foi efetuada por *barcoding*. A amplificação da região ITS foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, tendo sido observada a síntese de um fragmento de aproximadamente 600 bp, com a dimensão esperada da região ITS a amplificar (Figura 12).



**Figura 12.** Separação eletroforética dos amplicões correspondentes às regiões ITS dos isolados fúngicos, obtidos a partir de órgãos de oliveira. As regiões ITS foram amplificadas com os primers universais *ITS1-F* e *ITS4* e separadas num gel de agarose (1 %, p/v). C1 a C4: IPB-C1 a IPB-C4; P1 a P3: IPB-P1 a IPB-P3; C-: controle negativo, M: Marcador molecular 100 bp.

Após purificação dos produtos de PCR e sua sequenciação, a pesquisa BLASTN na base de dados UNITE revelou quais as melhores correspondências das sequências para cada isolado (Tabela 1).

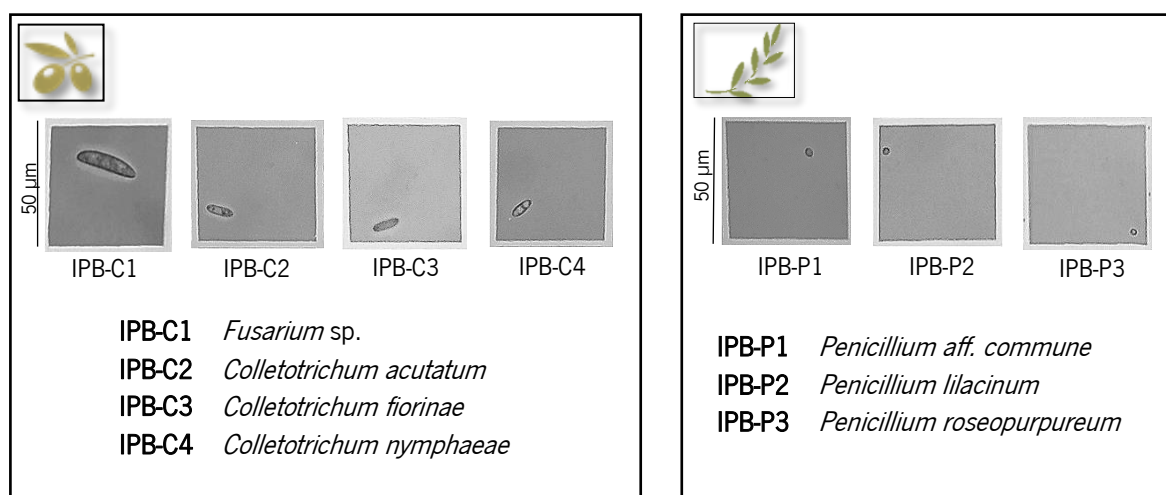
**Tabela 1.** Identificação dos isolados por *barcoding*, utilizando o *barcode* para fungos (ITS). Os isolados estão identificados pelo seu código, sendo também apresentado entre parêntesis a sua prévia identificação.

Proveniência dos isolados	Isolado	OTU	Número de acesso UNITE
	IPB-C1 ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> )	<i>Fusarium</i> sp.	MN504655
	IPB-C2 ( <i>Colletotrichum acutatum</i> )	<i>Colletotrichum acutatum</i>	MG004782
	IPB-C3 ( <i>Colletotrichum nymphaeae</i> )	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	MN545605
	IPB-C4 ( <i>Colletotrichum fioriniae</i> )	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	MN516553
	IPB-P1 ( <i>Penicillium lilacinum</i> )	<i>Penicillium lilacinum</i>	MN516739
	IPB-P2 ( <i>Penicillium commune</i> )	<i>Penicillium aff. commune</i>	MN371392
	IPB-P3 ( <i>Penicillium roseopurpureum</i> )	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	MK179263

A identificação taxonômica dos fungos é uma etapa crítica para garantir a reprodutibilidade das interações *in vitro* (Raja *et al.* 2017). Os isolados utilizados neste trabalho tinham sido previamente identificados usando uma combinação de características culturais e moleculares (Martins, 2020). Todas as identificações realizadas neste trabalho confirmaram as identificações prévias, à exceção do isolado IPB-P1. Este fora previamente identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*, mas a sequência de ITS submetida ao BLASTN na base de dados UNITE sugere o gênero *Fusarium*.

Para corroborar a identificação molecular dos isolados, foi igualmente efetuada a observação dos esporos (Figura 13). A forma dos esporos variou entre os isolados considerados neste estudo. Apresentaram forma globosa no gênero *Penicillium* e cilíndrica com extremidade arredondada no gênero *Colletotrichum*, concordando com as observações de Chowdappa *et al.* (2012). No caso de *Fusarium*

sp., os esporos eram alongados curvos – alantóides – e apresentaram um comprimento de cerca de 25  $\mu\text{m}$  estando de acordo com a literatura (Nelson *et al.* 1994; Trail *et al.* 2005). Os esporos dos isolados do género *Penicillium* apresentaram um diâmetro médio de 4  $\mu\text{m}$ , estando de acordo com as observações de Levetin (2013). No caso do género *Colletotrichum*, o comprimento médio dos esporos foi de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ , corroborando o registo de Photita *et al.* (2005). O aspeto morfológico dos fungos corrobora assim a identificação do isolado IPB-C1 como não pertencendo ao género *Colletotrichum*. Deste modo, este isolado não foi subsequentemente utilizado nas interações *in vitro* realizadas. Em contraste, a identificação dos isolados identificados como *Colletotrichum* spp. é corroborada pela sua proveniência, visto que foram isolados de azeitonas que apresentavam sintomatologia da doença da gafa.





**Figura 13.** Morfologia dos esporos dos isolados estudados: IPB-C1 – *Fusarium* sp.; IPB-C2 – *Colletotrichum acutatum*; IPB-C3 – *C. fiorinae*; IPB-C4 – *C. nymphaeae*; IPB-P1 – *Penicillium aff. commune*; IPB-P2 – *P. lilacinum*; IPB-P3 – *P. roseopurpureum*. Barra lateral corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

Tanto a dimensão, como a forma dos esporos, podem afetar criticamente a sua dispersão (Pringle *et al.* 2017). O facto do género *Penicillium* possuir uma reduzida dimensão de esporos permite a sua dispersão por longas distâncias (Norros *et al.* 2014), uma vez que os esporos menores permanecem em suspensão aérea mais tempo (Golan & Pringle, 2017). Contudo, a sua massa reduzida torna a sedimentação mais difícil (Golan & Pringle, 2017). Os fungos do género *Colletotrichum* e *Fusarium* sp. têm esporos de maiores dimensões, o que leva a uma menor dispersão aérea (Norros *et al.* 2014), apresentando, contudo, mais recursos disponíveis para o crescimento inicial das suas hifas (Calhim *et al.* 2018). Esta característica é relevante para o sucesso da colonização, pois facilita a sobrevivência em condições limitadas de nutrientes (Calhim *et al.* 2018). Além disso, a forma dos esporos do género *Colletotrichum* maximiza a sua velocidade de dispersão (Calhim *et al.* 2018).

### *Taxa de crescimento dos isolados*

Visto que os isolados irão ser utilizados em ensaios de co-cultura, torna-se relevante determinar a sua taxa de crescimento. Após sete dias de crescimento em meio PDA, o valor médio do raio das colónias fúngicas variou entre 0,9 e 2,4 cm (Tabela 2). Os fungos isolados de azeitonas com sintomas (*Colletotrichum* spp.) apresentaram uma taxa de crescimento maior, relativamente ao isolados de folhas e ramos são (*Penicillium* spp.). *Colletotrichum acutatum* apresentou a maior taxa de crescimento registada e *Penicillium roseopurpureum* a menor.

**Tabela 2.** Valor médio do raio das colónias (cm) dos isolados, após sete dias de incubação a 23 °C, no escuro, em meio PDA.

Proveniência dos isolados	Isolados fúngico	Valor médio do raio da colônia (cm)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	2,1±0,09
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	1,9±0,1
	<i>Colletotrichum fiorinae</i>	1,8±0,06
	<i>Penicillium lilacinum</i>	1,1±0,06
	<i>Penicillium commune</i>	1,3±0,08
	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	0,9±0,1

Os fungos com maior taxa de crescimento conseguem colonizar mais espaço, no mesmo período de tempo, que fungos com menor taxa de crescimento, acedendo mais rapidamente a determinado substrato (Fukami *et al.* 2010). A ordem de chegada das espécies ao substrato é um fator chave na estrutura das funções e comunidades do ecossistema (Fukami *et al.* 2010), uma vez que, as espécies iniciais podem ganhar vantagem na utilização de recursos e afetar os fungos que chegam posteriormente (Song *et al.* 2015).

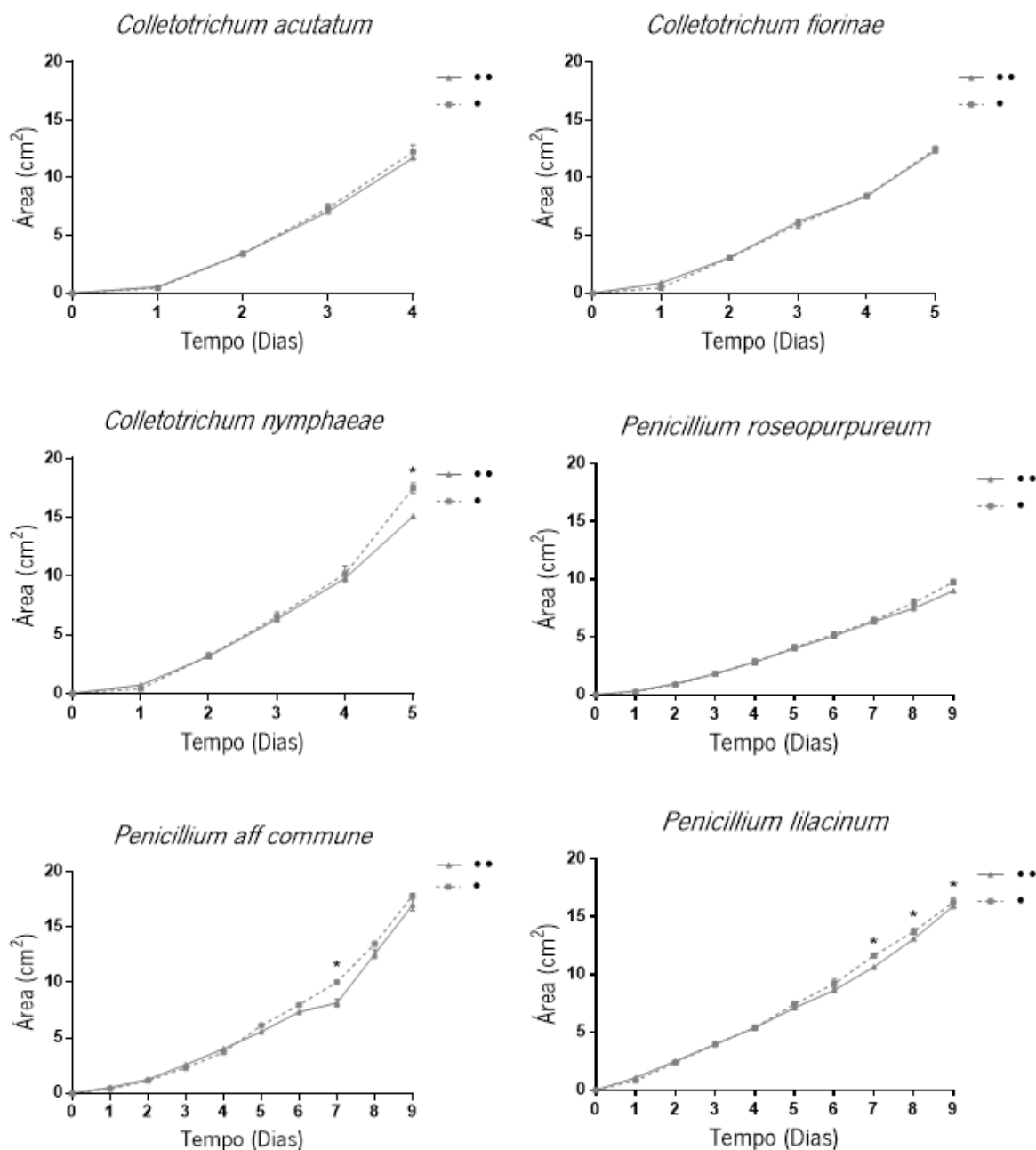
### *Interações intraespecíficas à distância*

De modo a compreender as relações intraespecíficas dos isolados, foi analisado o seu crescimento em cultura dupla (crescimento com dois inóculos do mesmo isolado) e comparado com a situação controlo (crescimento a partir de um único inóculo). O crescimento de *Colletotrichum fiorinae* não foi inibido quando cultivado em cultura dupla, não havendo igualmente diferenças significativas no crescimento de *C. acutatum* e *P. roseopurpureum* (Figura 14). Apenas se verificou inibição do crescimento estatisticamente significativa nos fungos *C. nymphaeae* (dia 5) e *P. lilacinum* (a partir do dia 7). De notar que o isolado *P. aff. commune* apenas apresentou diferenças significativas no dia 7.

Os fungos fitopatogénicos e simbiotes que vivem em associação com hospedeiros vegetais, geralmente usam mecanismos de *quorum sensing* para comunicarem entre si. Este mecanismo é mediado por diversas moléculas de sinalização, difundíveis, que se acumulam extracelularmente (Hogan, 2004). Dado que as culturas duplas de *C. nymphaeae*, *P. aff. commune* e *P. lilacinum* demonstraram



inibição à distância, a produção de moléculas autoinibidoras poderá permitir uma diminuição da competição dentro das populações, tal como sugerido por Hogan (2004).



**Figura 14.** Variação da área (cm<sup>2</sup>) ocupada pelos diferentes fungos ao longo do tempo, em ensaios de co-cultura intraespecífica. Os valores obtidos pelo crescimento do isolado em cultura dupla (• •) são comparados com a situação controle (•). \*: diferença estatística com significância de 5 %. (n = 3).

#### *Interações Penicillium spp./Colletotrichum spp.*

As interações à distância, entre isolados de *Penicillium* spp. e de *Colletotrichum* spp., foram avaliadas pela determinação do Índice de Velocidade de Crescimento Microbiano (IVCM) dos fungos três dias após as inoculações. O IVCM de *Penicillium* spp. e de *Colletotrichum* spp. foi comparado entre as

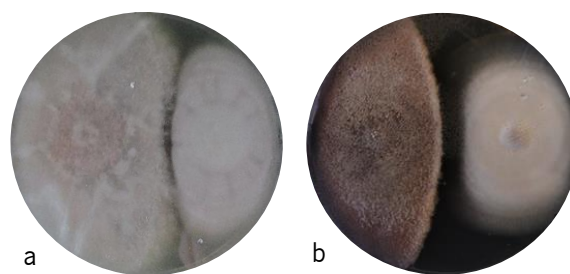
situações de co-cultura e as situações controlo. Os resultados foram classificados consoante não havia variação do IVCM (0); o IVCM era superior na situação controlo (+); ou era menor na situação controlo (-). Desta forma, as diferentes interações (*Penicillium* spp./ *Colletotrichum* spp.) foram classificadas em: (-/+); (0/+); (+/+); (-/0); (0/0); (+/0); (-/-); (0/-); ou (+/-) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tipos de interação entre *Colletotrichum* spp. e *Penicillium* spp. avaliadas ao fim de 3 e de 15 dias após inoculação. As interações foram classificadas com base na razão dos índices de velocidade de crescimento microbiano registado em co-cultura [IVCM(cc)] e cultura simples [IVCM(c)], registados após três dias de inoculação. O tipo de interação em que se verificou a diminuição de IVCM de *Colletotrichum* spp. estão assinaladas a negrito. O tipo de interação de contacto foi definido após 15 dias da inoculação, sendo apresentado com a simbologia descrita na Figura 1.

Co-cultura	IVCM (cc) / IVCM (c)		Tipo de Interação (3 dias)	Tipo de Interação (15 dias)
	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Colletotrichum</i> spp.		
<b>Interações com apenas um endófito</b>				
<i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>fiorinae</i>	0,9	1,1	(-/+)	→ ←
<i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>acutatum</i>	1	1,1	(0/+)	→ ←
<i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>acutatum</i> +C. <i>fiorinae</i>	0,9	0,8	<b>(-/-)</b>	→←←
<i>P. lilacinum</i> /C. <i>fiorinae</i>	1,1	1	(+/0)	→ ←
<i>P. lilacinum</i> /C. <i>acutatum</i>	1,1	1	(+/0)	→←←
<i>P. lilacinum</i> /C. <i>acutatum</i> +C. <i>fiorinae</i>	0,9	1	(-/0)	→←←
<i>P. aff. commune</i> /C. <i>fiorinae</i>	0,9	0,9	<b>(-/-)</b>	→ ←
<i>P. aff. commune</i> /C. <i>acutatum</i>	1,1	1,1	(+/+)	→ ←
<i>P. aff. commune</i> /C. <i>acutatum</i> +C. <i>fiorinae</i>	0,8	0,8	<b>(-/-)</b>	→ ←
<b>Interações com dois endófitos</b>				
<i>P. lilacinum</i> + <i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>fiorinae</i>	1	0,9	<b>(0/-)</b>	→ ←
<i>P. lilacinum</i> + <i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>acutatum</i>	0,9	0,9	<b>(-/-)</b>	→←←
<i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>fiorinae</i>	1,4	0,7	<b>(+/-)</b>	→ ←
<i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>acutatum</i>	1,1	1,1	(+/+)	→ ←
<b>Interações quadrúplas</b>				
<i>P. lilacinum</i> + <i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>acutatum</i> +C. <i>fiorinae</i>	1	0,9	<b>(0/-)</b>	→←←
<i>P. aff. commune</i> + <i>P. roseopurpureum</i> /C. <i>acutatum</i> +C. <i>fiorinae</i>	1,1	0,1	<b>(+/-)</b>	→ ←

Os resultados revelaram que os valores de IVCM e o tipo de interação, variam conforme os fungos interatuantes. As espécies de *Penicillium*, que revelaram capacidade de diminuir o IVCM de espécies *Colletotrichum* três dias após inoculação, foram *P. roseopurpureum* e *P. aff. commune*. *P. lilacinum* só diminuiu o IVCM das espécies de *Colletotrichum* quando na presença de outro endófito, (*P. roseopurpureum* ou *P. aff. commune*). Além disso, o seu efeito antagonista foi mais evidente para *C. fiorinae* do que para *C. acutatum*. Das 10 interações de *C. fiorinae*, 7 resultaram numa inibição do crescimento de *Penicillium* spp.. Já nas 10 interações de *C. acutatum*, 5 interações resultaram na

redução do crescimento do agente fitopatogénico. Em alguns casos, verificou-se um efeito sinérgico de dois endófitos na inibição do agente fitopatogénico. Por exemplo, enquanto *P. roseopurpureum* e *P. lilacinum* não foram eficazes, individualmente, de antagonizarem as espécies de *Colletotrichum*, em conjunto apresentaram capacidade de inibição de ambas as espécies fitopatogénicas. O efeito inverso foi igualmente detetado. Apesar de *P. roseopurpureum* não ter conseguido inibir o crescimento de *C. acutatum* e *C. fiorinae* quando inoculados individualmente, conseguiu inibir o crescimento de ambos quando estes foram inoculados em combinação. Todos estes resultados sugerem a especificidade de cada uma das interações, não permitindo uma extrapolação para interações combinadas com mais fungos. Posto isto, das 15 interações *Penicillium* spp./ *Colletotrichum* spp. estabelecidas, 8 diminuíram o IVCM de *Colletotrichum* spp.. Como as alterações nos IVCM dos fungos foram observadas antes do estabelecimento do contacto micelial, aos três dias após inoculação, o mecanismo de ação subjacente às alterações de IVCM é a antibiose. A antibiose envolve a produção de substâncias como enzimas, antibióticos, substâncias voláteis e não voláteis, pelos fungos (Woodward & Boddy, 2008). Após 15 dias de interação entre *Penicillium* spp. e *Colletotrichum* spp., as culturas foram novamente classificadas, agora quanto ao tipo de contacto entre as colónias (Tabela 3). A maior parte das interações (10) exibiu uma interação de contacto do tipo de inibição à distância (tipo 2), sendo que apenas cinco exibiram uma interação de inibição de contacto (tipo 1). A capacidade de inibição à distância por parte de *Penicillium* spp., sugere a sua maior capacidade competitiva relativamente ao espaço. Nas interações em que não se verificou inibição à distância, *Colletotrichum* spp. acabou por dominar a área contendo meio nutritivo, limitando a expansão de *Penicillium* spp. (Figura 15).

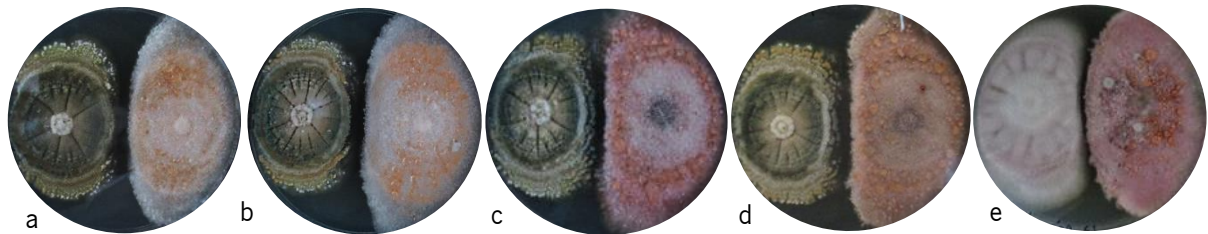


**Figura 15.** Tipo de interações observadas ao fim de 15 dias após inoculação em meio PDA. a: inibição de contacto (*P. lilacinum*/*C. acutatum* + *C. fiorinae*; b: inibição à distância (*P. lilacinum* / *C. fiorinae*).

Assim, fungos *Penicillium* spp. podem suprimir o crescimento de *Colletotrichum* spp. através da antibiose, evidenciada pela zona de inibição no confronto entre dois micélios interagentes. Das 12 co-culturas que demonstram interação de contacto do tipo 2 (inibição à distância), cinco demonstraram também diminuir o IVCM de *Colletotrichum* spp., três dias após inoculação (Figura 16). Assim, a

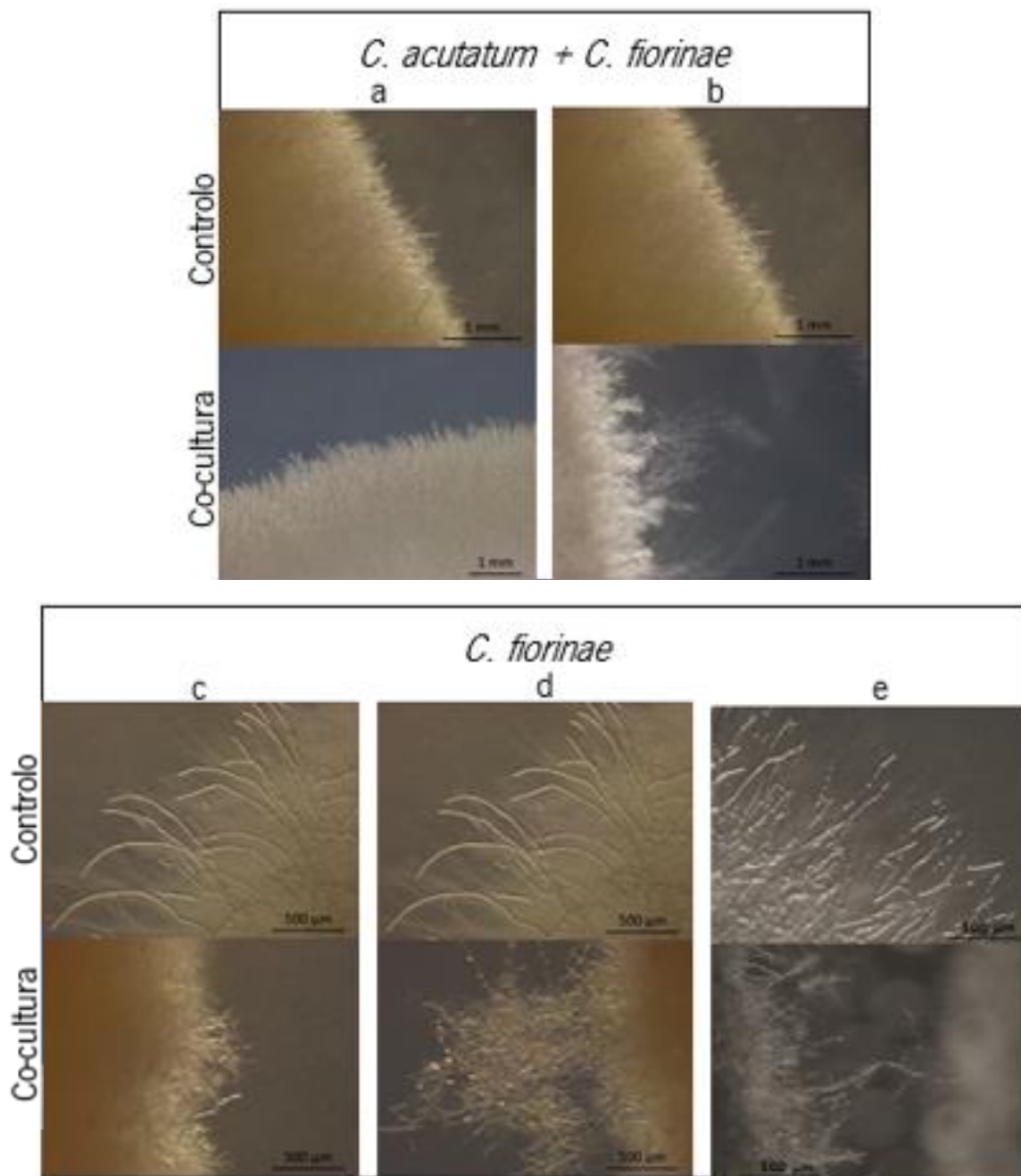
morfologia das hifas de *Colletotrichum* spp. nas interações representadas na figura 16 foram observadas com a lupa eletrónica, a fim de determinar os efeitos provocados por *Penicillium* spp. (Figura 17).

Os resultados sugerem que dos isolados de *Colletotrichum* spp. testados, *C. fiorinae* foi o mais



**Figura 16.** Co-culturas em que se verificou interação de contacto do tipo 2 (inibição à distância) e diminuição do IVC de *Colletotrichum* spp. em interações à distância. a: *P. aff. commune* / *C. acutatum*+*C. fiorinae*; b: *P. aff. commune*+*P. roseopurpureum* / *C. acutatum*+*C. fiorinae*; c: *P. aff. commune* / *C. fiorinae*; d: *P. aff. commune*+*P. roseopurpureum* / *C. fiorinae*; e: *P. lilacinum*+*P. roseopurpureum* / *C. fiorinae*.

inibido por *Penicillium* spp. e os isolados com maior capacidade de inibição foram *P. aff. commune* e *P. roseopurpureum* (Tabela 3). *P. aff. commune*, num estudo anterior já demonstrara inibição do crescimento do fitopatogénico *C. acutatum*, em condições *in vitro* (Martins *et al.* 2013). Em todas as co-culturas representadas na figura 16, foram induzidas alterações morfológicas nas hifas de *Colletotrichum* spp., à exceção da interação *P. aff. commune* / *C. fiorinae*+*C. acutatum* (Figura 17). O micélio de *C. fiorinae* apresentou agregação de hifas na presença de *P. aff. commune*, *P. aff. commune*+*P. roseopurpureum* e *P. lilacinum*+*P. roseopurpureum* (Figura 17). Sendo que, na presença de duas espécies *Penicillium* a agregação foi mais evidente, do que na presença de apenas uma. Em comparação com a situação controlo, o micélio de *C. fiorinae*+*C. acutatum* não apresentou alterações na presença de *P. aff. commune*. Contudo, na presença de *P. aff. commune*+*P. roseopurpureum* verificou-se a ramificação das hifas de *C. fiorinae* (Figura 17). Estes resultados refletem um mecanismo de antibiose mais eficaz na presença de duas espécies *Penicillium* do que na presença de apenas uma (Tabela 3).



**Figura 17.** Hifas de *Colletotrichum* spp. na situação controlo e de co-cultura. Co-cultura: a- *P. aff. commune* /*C. acutatum*+*C. fiorinae*; b- *P. aff. commune*+*P. roseopurpureum*/*C. acutatum*+*C. fiorinae*; c- *P. aff. commune*/*C. fiorinae*; d- *P. aff. commune*+*P. roseopurpureum*/*C. fiorinae*; e: *P. lilacinum*+*P. roseopurpureum*/*C. fiorinae*.

## 2.4. Conclusão

Das 15 co-culturas *Penicillium* spp./*Colletotrichum* spp. realizadas, quatro estimularam, oito antagonizaram e três não tiveram qualquer efeito no crescimento de *Colletotrichum* spp., três dias após inoculação. A competição territorial em todas as co-culturas manifestou-se em *deadlock* – nenhuma espécie conseguiu progredir – sendo que, três interações exibiram inibição de contacto e 12 interações

exibiram inibição à distância. Dos inóculos *Colletotrichum* spp. testados, *C. fiorinae* foi o mais inibido por *Penicillium* spp. e os inóculos com maior capacidade de inibição foram *P. aff. commune* e *P. roseopurpureum*. A inibição foi conseguida devido a mecanismos de antibiose por parte de *Penicillium* spp., o que permitiu aumentar a sua capacidade competitiva pelo espaço. As interações que apresentaram maior antagonismo foram: *P. aff. commune/C. acutatum+C. fiorinae*; *P. aff. commune/C. fiorinae*; *P. aff. commune+P. roseopurpureum/C. acutatum+C. fiorinae*; *P. aff. commune+P. roseopurpureum/C. fiorinae*; *P. lilacinum+ P. roseopurpureum/C. fiorinae*. Nestas co-culturas foram induzidas alterações morfológicas nas hifas de *Colletotrichum* spp. à exceção da co-cultura *P. aff. commune/C. fiorinae+C.acutatum*. As anomalias observadas consistiram na ramificação ou agregação de hifas, sendo que os danos foram mais evidentes na presença de duas espécies *Penicillium*, do que na presença de apenas uma. A fim de estabelecer a eficácia *in vivo* de *P. aff. commune*, *P. roseopurpureum* e *P. lilacinum* como agentes de biocontrolo da doença da gafa, é ainda necessária investigação adicional. Visto que a produção de metabolitos secundários depende da composição do meio, os metabolitos produzidos *in vitro* podem não ser expressos ou ter menor expressão *in vivo* (Laur *et al.* 2018).

## 2.5. Referências bibliográficas

- Arnold A, Mejia L, Kylo D, Rojas E, Maynard Z, Robbins N, Herre E. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci* 100:15649–15654.
- Boddy L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 185-194.
- Bonfante P, Desirò A. 2017. Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *ISME Journal* 11: 1727-1735.
- Bosmans L, De Bruijn I, De Mot R, Rediers H, Lievens B. 2016. Agar composition affects *in vitro* screening of biocontrol activity of antagonistic microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 127: 7–9.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Themaat EVL, Annu PSL. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Plant Biology* 64: 807-838.
- Busby PE, Ridout M, Newcombe G. 2016. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology* 90:645-655.
- Calhim S, Halme P, Petersen JH, Læssøe T, Bässler C, Heilmann-Clausen J. 2018. Fungal spore diversity reflects substrate-specific deposition challenges. *Scientific Reports* 1:1-9.
- Gomes T, Pereira JA, Lino-Neto T, Bennett AE, Baptista P. 2019. Bacterial disease induced changes in fungal communities of olive tree twigs depend on host genotype. *Scientific Reports* 9: 5882.

- Gomes T, Pereira JA, Benhadi J, Lino-Neto T, Baptista P. 2018. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungal communities are shaped by different environmental factors in a Mediterranean ecosystem. *Microbial Ecology* 76: 668-679.
- Griffith H, Debois D, Franzil L, Pauw E, Thonart P, Ongena M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/ *amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology* 8: 281-295.
- Chowdappa P, Chethana CS, Bharghavi R, Sandhya H, Pant RP. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing anthracnose of orchids in India. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering* 2: 567–572
- Costa D, Fernandes T, Martins F, Pereira JA, Tavares RM, Santos PM, Baptista P, Lino-Neto T. 2020. Illuminating *Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research* 245: 126693
- Fukami T, Dickie I, Wilkie JP. 2010. Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecol Lett* 13:675–684
- Freeman S, Rodriguez RJ. 1993. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260:75–78.
- Gao FK, Dai CC, Liu XZ. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr J Microbiol Res* 13:1346–1351.
- Golan JJ, Pringle A. 2017. Long-distance dispersal of fungi. *Microbiol Spectrum* 5.
- Griffith G, Rayner A, Wildmam H. 1994. Interspecific interactions, mycelial morphogenesis and extracellular metabolite production in *Phlebia radiata* (Aphyllphorales). *Nova Hedwigia* 59: 311-334.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79: 293–320.
- Hogan DA, Vik A, Kolter R. 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol. Microbiol.* 54:1212–1223.
- Kurose D, Furuya N, Tsuchiya K, Tsushima S, Evans HC. 2012. Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoniamphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Fungal Biol* 116:785–791.
- Lacava PT, Azevedo JL. 2014. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. *In*: Verma VC, Gange AC (eds) *Advances in endophytic research part v*. Springer India, New Delhi, pp 231–256.
- Levetin E. 2013. Basic aeroallergen course fungal spore morphology.
- Lindow SL, Brandl MT. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875-1883.
- Martins F. 2020. Endophytic fungi of olive tree and their exploitation in the biological control of olive anthracnose. Doctoral dissertation in Biosystems Engineering. Universidad de León.

- Martins F, Pereira JA, Bota P, Bento A, Baptista P. 2013. Plant-mediated effects on antagonistic activity of endophytic fungi towards olive fungal diseases. 5th international symposium in plant protection and plant health in Europe/COST action – endophytes for plant protection: the state of the art, Humboldt University, Berlin (26–29 May 2013).
- Mina D, Pereira JA, Lino-Neto T, Baptista P. 2020. Epiphytic and endophytic bacteria on olive tree phyllosphere: exploring tissue and cultivar effect. *Microbial Ecology* 80:145–157.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479-504.
- Norros V, Rannik U, Hussein T, Petäjä T, Vesala T, Ovaskainen O. 2014. Do small spores disperse further than large spores? *Ecology* 95:1612–1621.
- Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55:113–128.
- Laur J, Ramakrishnan GB, Labbé C, Lefebvre F, Spanu PD, Bélanger RR. 2018. Effectors involved in fungal–fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent–powdery mildew–plant. *New Phytol* 217:713–725.
- Photita W, Taylor PWJ, Ford R, Hyde KD, Lumyong S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*. 18:117-133.
- Pliego C, Ramos C, de Vicente A, and Cazorla FM. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340: 505–520.
- Pringle A, Brenner MP, Fritz JA, Roper M, Seminara A. 2017. Reaching the wind: boundary layer escape as a constraint on ascomycete spore shooting. Florida: CRC Press.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ e Oberlies NH. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* 80: 756-770.
- Rodríguez MA, Rothen C, Lo TE, Cabrera GM, Godeas AM. 2015. Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAFC1646. *Biocontrol Sci Technol*.
- Rodríguez-Estrada AE, Jonkers W, Kistler HC, May G. 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Gen Biol* 49: 578–587.
- Schulz B, Haas S, Junker C, Andrée N, Schobert M. 2015. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science* 109: 39-45.
- Shehata HR, Lyons EM, Jordan KS, Raizada MN. 2016. Relevance of *in vitro* agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. *BMC Microbiol*. 16 :7.
- Song Z, Vail A, Sadowsky MJ, Schilling JS. 2015. Influence of hyphal inoculum potential on the competitive success of fungi colonizing wood. *Microbial Ecology* 4: 758-767
- Trail F, Gaffoor I, Vogel S. 2005. Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genetics and Biology* 42: 528–533.



Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol* 41: 455–482.

Webster J, Davey RA. 1984. Sigmoid conidial shape in aquatic fungi. *British Mycological Society* 83: 43–52.

Woodward S, Boddy L. 2008. Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. In: Boddy, L., Frankland, J.C., van West, P. (Eds.), *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. Elsevier, Oxford, pp. 125e142.

### 3. Avaliação da comunidade fúngica da azeitona por *metabarcoding*

```
cctaaccgttgcttcggc  
ggggacggggcgcccgc  
ataattaaacttttaac  
taatgtgaattgcagaat  
gagcatgcctgttcgagc  
ggcccttaaaggtagtgg  
ccggagggactccttgccg  
ctgaacttaagcatatca
```

```
aaccgttgcttcggcgggcagg  
gacggggcgcccgcggaggaa  
attaaacttttaacaacggat  
tgtgaattgcagaattcagtga  
catgcctgttcgagcgtcatt  
ccttaaaggtagtggcggacc  
gagggactccttgccgtaaaac  
aacttaagcatatcaataagc
```



```
cctaaccgttgcttcggc  
ggggacggggcgcccgc  
ataattaaacttttaac  
taatgtgaattgcagaat  
gagcatgcctgttcgagc  
ggcccttaaaggtagtgg  
ccggagggactccttgccg  
ctgaacttaagcatatca
```

```
aaccgttgcttcggcgggcagg  
gacggggcgcccgcggaggaa  
attaaacttttaacaacggat  
tgtgaattgcagaattcagtga  
catgcctgttcgagcgtcatt  
ccttaaaggtagtggcggacc  
gagggactccttgccgtaaaac  
aacttaagcatatcaataagc
```

### 3.1. Introdução

O microbioma das plantas contribui significativamente para a resposta do hospedeiro ao stresse biótico e abiótico (Gupta & Gopal, 2016) e para a sua aptidão em geral (Vandenkoornhuysen *et al.* 2015). Posto isto, torna-se relevante adquirir mais informações sobre as comunidades microbianas que interagem com as plantas, em particular naquelas espécies que estão a enfrentar limitações na sua produção, como é o caso da oliveira. Várias pesquisas focaram-se, recentemente, no estudo do seu microbioma usando abordagens culturais (Gomes *et al.* 2018; Materatski *et al.* 2019; Mina *et al.* 2020). Contudo, as técnicas culturais apenas detetam parte da comunidade microbiana (Cao *et al.* 2017), ao contrário das metodologias que recorrem a técnicas de sequenciação de elevado débito (HTS), que permitem uma melhor deteção da comunidade (Schlaeppli & Bulgarelli, 2015). Apesar disso, têm vindo a ser realizados poucos estudos em oliveira, que recorrem a estas estratégias de identificação baseadas em HTS. Uma dessas estratégias - *metabarcoding* - permite a avaliação da biodiversidade de amostras ambientais, consistindo na extração de DNA ambiental e amplificação de uma região *barcode* para sequenciação subsequente por HTS (Edgar, 2013; Kowalska *et al.* 2019). Especificamente, para a análise da diversidade fúngica em amostras ambientais, o *barcode* mais aceite na comunidade científica é a região ITS (Ghosh *et al.* 2019).

Apesar das abordagens por *metabarcoding* serem altamente eficazes para o estudo do microbioma, existem desafios e limitações a serem considerados (Cao *et al.* 2017). As reduzidas taxas de anotações de elevada confiança dificultam a interpretação funcional de dados de DNA, RNA e seqüências de proteínas microbianas (Thomas *et al.* 2012). Outra preocupação é que a abordagem metagenómica não permite distinguir populações microbianas viáveis de não viáveis (Ercolini, 2013). Além disso, as limitações surgem, porque a extração do microbioma associado à planta é quase inevitavelmente “contaminado” com DNA, RNA ou proteínas do hospedeiro (Schlaeppli & Bulgarelli, 2015). Tal contaminação pode ser particularmente relevante em preparações de endófitos (Schlaeppli & Bulgarelli, 2015), pelo que, são necessárias várias réplicas para se obterem análises robustas, levando a uma carga financeira e computacional substancial (Knight *et al.* 2012). Quando são utilizadas amostras ambientais, como solo e água, que contêm um grande número de microrganismos (Cao *et al.* 2017), são obtidas quantidades de ácidos nucleicos suficientes para análise subsequente. Pelo contrário, algumas matrizes, como é o caso da azeitona tornam o isolamento do DNA um desafio (Anvarian *et al.*, 2016). Neste caso, os iões metálicos, lipídios, e proteínas, são susceptíveis de inibir o isolamento dos ácidos nucleicos e outros procedimentos experimentais a jusante (Ahn *et al.* 2014), levando à recuperação de ácido nucleico de baixa qualidade ou falha da reação de PCR (Cao *et al.* 2017). Além

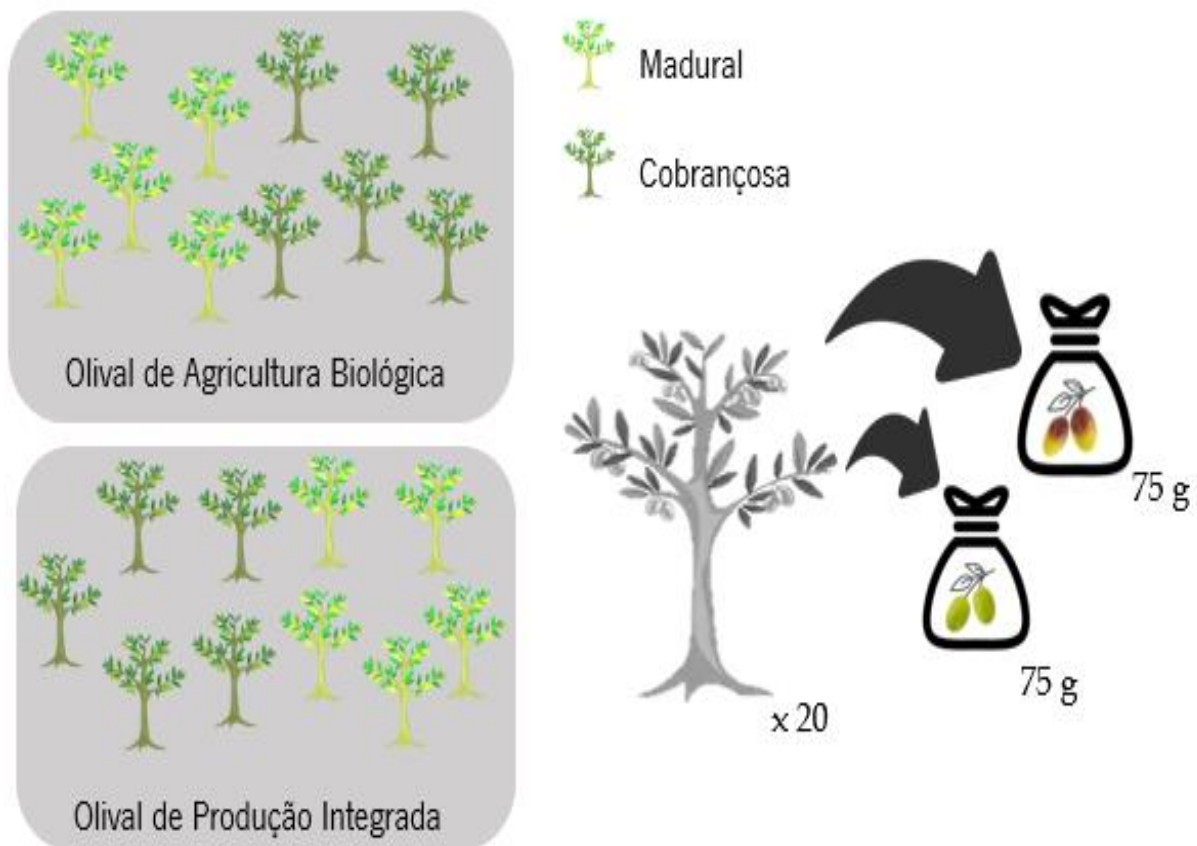
desses inibidores poderem ser difíceis de remover, este problema é especialmente agravado quando as amostras contêm uma carga microbiana baixa (Cao *et al.* 2017).

Apenas houve um estudo que relatou a diversidade de fungos da carposfera da oliveira, recorrendo a uma abordagem por *metabarcoding*, no entanto, usou apenas uma única cultivar (Ottobratica) e não discriminou entre a comunidade endofítica e epifítica (Abdelfattah *et al.* 2015). Neste trabalho, a comunidade microbiana endofítica e epifítica da azeitona foram avaliadas por *metabarcoding*, utilizando a região ITS para identificação de fungos e a plataforma *Illumina MiSeq*. As comunidades fúngicas endofíticas e epifíticas foram avaliadas em azeitonas em dois estados de maturação (verdes e semi-maduras), provenientes de diferentes cultivares de oliveira (Cobrançosa e Madural), com diferentes regimes de produção (agricultura biológica e produção integrada). Com este estudo, pretendemos 1) obter uma melhor compreensão sobre a comunidade microbiana fúngica da endosfera e episfera da azeitona, 2) decifrar o efeito do genótipo do hospedeiro (a nível da cultivar), regime de produção da azeitona e índice de maturação do fruto na estruturação da comunidade fúngica endofítica e epifítica da azeitona, e 3) selecionar potenciais agentes de biocontrolo.

## 3.2. Material e métodos

### *Material biológico e amostragem*

As azeitonas utilizadas neste trabalho foram colhidas em dois olivais localizados em Bragança. Um dos olivais é gerido de acordo com as directrizes da produção integrada (Suções, Bragança) e outro da produção biológica (Vale de Telhas, Bragança). Ambos os olivais amostrados continham duas cultivares (Cobrançosa e Madural), tendo sido amostradas cinco árvores de cada cultivar, em cada olival/regime de cultivo. De cada árvore foram recolhidas 75 g de azeitonas aparentemente saudáveis. A amostragem foi efetuada a 25 de setembro de 2019 (azeitonas verdes) e repetida a 17 de outubro de 2019 (azeitonas semi-maduras) (Figura 18 e Tabela 4). As amostras foram coletadas em sacos de plástico estéreis, mantidas a 4°C e processadas até dois dias. No laboratório, todas as azeitonas foram observadas com uma lupa eletrónica (Leica S9 D, Leica Microsystems, Germany), acoplada a uma câmara digital (Leica MC170 HD), de modo a garantir que não fossem consideradas neste estudo azeitonas picadas por *Bactrocera oleae*, vetor da doença da gafa (Figura 19).



**Figura 18.** Amostras recolhidas para avaliação da comunidade endofítica e epifítica por *metabarcoding*. De cada regime de cultivo foram amostrados dois cultivares de oliveira (Cobrançosa e Madural), tendo sido recolhidas azeitonas verdes (75 g) e semi-maduras de cinco árvores aparentemente saudáveis.



**Figura 19.** Observação com a lupa eletrónica de azeitona picada por *Bactrocera oleae*.

**Tabela 4.** Amostras recolhidas para avaliação da comunidade endofítica e epifítica por *metabarcoding*. De cada regime de cultivo foram amostrados dois cultivares de oliveira (Cobrançosa e Madural), tendo sido recolhidas azeitonas verdes (75 g) e semi-maduras de cinco árvores aparentemente saudáveis. As amostragens foram efetuadas a 25 de setembro de 2019 (azeitonas verdes) e repetida a 17 de outubro de 2019 (azeitonas semi-maduras).

Regime de Cultivo	Maturação	Cultivar	Árvore	Amostras	
Agricultura Biológica	Verdes	Cobrançosa	1	1.AC1	
			2	1.AC2	
			3	1.AC3	
			4	1.AC4	
			5	1.AC5	
	Semi-maduras	Madural	1	1.AM1	
			2	1.AM2	
			3	1.AM3	
			4	1.AM4	
			5	1.AM5	
	Produção Integrada	Verdes	Cobrançosa	1	2.AC1
				2	2.AC2
				3	2.AC3
				4	2.AC4
				5	2.AC5
Semi-maduras		Madural	1	2.AM1	
			2	2.AM2	
			3	2.AM3	
			4	2.AM4	
			5	2.AM5	
Produção Integrada	Verdes	Cobrançosa	1	1.PC1	
			2	1.PC2	
			3	1.PC3	
			4	1.PC4	
			5	1.PC5	
	Semi-maduras	Madural	1	1.PM1	
			2	1.PM2	
			3	1.PM3	
			4	1.PM4	
			5	1.PM5	
Produção Integrada	Verdes	Cobrançosa	1	2.PC1	
			2	2.PC2	
			3	2.PC3	
			4	2.PC4	
			5	2.PC5	
	Semi-maduras	Madural	1	2.PM1	
			2	2.PM2	
			3	2.PM3	
			4	2.PM4	
			5	2.PM5	

#### *Preparação das amostras de azeitona para obtenção de DNA endofítico e epifítico*

Cada amostra de azeitonas foi dividida por 3 tubos de 50 mL (25 g de azeitonas/tubo). A cada tubo adicionou-se 50 mL de água peptonada (10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, pH 7,2) com Tween 20 (0,1%, v/v) e colocou-se em agitação (200 rpm), na horizontal, a 20 °C. Após 2 horas de agitação, as azeitonas foram recolhidas e armazenadas a 5°C, para subsequente extração da comunidade endofítica. O sobrenadante foi centrifugado a 4.500 *g* e o *pellet* obtido armazenado a – 80°C para posterior extração de DNA e avaliação da comunidade epifítica. Para obtenção da comunidade endofítica, quatro azeitonas

de cada amostra foram selecionadas aleatoriamente, procedendo-se à esterilização da sua superfície. A esterilização foi realizada pela imersão sequencial das azeitonas em: 1 minuto em etanol a 70% (v/v), 1 minuto em lixívia (cloro 3-5%) e três lavagens de 1 minuto em água destilada estéril. A situação controlo deste procedimento foi realizada rolando uma azeitona esterilizada, de cada amostra, numa placa com meio PDA e incubando durante 48h a 37°C. Após a esterilização da superfície das azeitonas, o seu caroço foi retirado, sendo armazenadas a -80°C até extração de DNA.

### ***Extração e amplificação de DNA dos fungos***

O DNA genómico dos epífitos foi extraído através de uma adaptação ao protocolo de Ahmadi *et al.*, (2018) (anexo 1). Posteriormente o DNA genómico dos fungos endófitos foi extraído a partir das azeitonas maceradas com nitrogénio líquido através de uma adaptação ao protocolo de Abdelfattah *et al.* (2015) (anexo 2). Após a extração de DNA, para validação da capacidade de amplificação do DNA, efetuou-se uma reação da polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação do *barcode* ITS dos fungos, utilizando os *primers* universais *ITS3* e *ITS4* (no caso das amostras de epífitos) e *ITS1-F* e *ITS2* (no caso das amostras de endófitos). As reações de amplificação decorreram num volume total de 10 µL, contendo: 0,5 µL de cada primer a 10 mM, 5 µL *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYtech, Portugal); 3 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA. Foi também preparado um controlo negativo, sem DNA, a fim de excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes. As reações de PCR foram efetuadas num tercociclador (Bio-Rad T100 Thermal Cycler), utilizando o seguinte programa para amostras de epífitos: desnaturação inicial – 5 min a 94 °C; 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C e 1 min a 72 °C; alongamento final – 10 min a 72 °C. No caso de se tratarem de amostras de endófitos o programa foi adaptado para: desnaturação inicial – 1 min a 94 °C; 30 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 68 °C; alongamento final – 1 min a 68 °C. Para confirmar a amplificação da região ITS foi realizada uma eletroforese com gel de agarose a 1% (p/v). A concentração e a pureza do DNA das amostras foram quantificadas com o espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, USA).

### ***Sequenciação e processamento de dados***

O DNA extraído dos fungos foi preparado e sequenciado por um provedor de serviços de sequenciação (Biocant, Portugal). Após amplificação da região ITS2 com os *primers* *ITS3* e *ITS4*, a sequenciação por *paired-end*, decorreu numa plataforma *Illumina (Illumina MiSeq)*. Foi escolhida a região ITS2, por ser considerada mais fácil de alinhar (Lindahl *et al.* 2013) e melhor representada nas bases de dados (Nilsson *et al.* 2009) do que a do região ITS1. O relatório da qualidade de cada sequência foi visualizado no *FastQC* (Andrews, 2010), sendo o corte das *reads* efetuado com base na sua qualidade,

através do *software Sickle* (Joshi & Fass, 2011), usando os parâmetros padrão. O módulo *Bayeshammer* do pacote *SPAdes* (Nurk *et al.* 2013) foi usado para corrigir erros nas *reads*, antes da sua fusão realizada com *Usearch* versão 8.0.1623 (Edgar, 2010). Com o *fastq-mcf* do pacote *ea-utils* (Aronesty, 2011) realizou-se uma filtragem, com base no tamanho das sequências, a fim de selecionar apenas aquelas com o tamanho esperado do *amplicon* (entre 340 e 415 pb). O *pipeline* do *software micca* versão 1.7.0 (Albanese *et al.* 2015) foi realizado: i) para carregar o conjunto de dados num único arquivo FASTQ; ii) para descartar sequências com uma taxa de erro esperada maior que 1%; iii) para agrupar sequências semelhantes (limite de 97% de identidade) em ASVs e remover sequências quiméricas; e iv) para atribuir taxonomia a cada ASV, tendo por referência a base de dados UNITE versão 8.0 (Nilsson *et al.* 2018). As sequências não identificadas foram pesquisadas, usando NCBI-Blast, para determinar a sua classificação taxonômica e as não classificadas foram excluídas das análises subsequentes. Uma vez que foram detetadas diferenças na profundidade da amostragem e para atenuar enviesamento de resultados, todos os conjuntos de dados foram subamostrados usando *QIIME* 1.9.0 (Caporaso *et al.* 2010), para um número de 2.208 *reads* (descartando a amostra de epífitos 2.PC5).

### ***Análise de diversidade e similaridade***

De modo a explorar a riqueza e abundância das comunidades epifíticas e endofíticas analisadas neste trabalho, considerando a classificação taxonômica das ASVs identificadas, foram gerados esquemas Krona (Ondov *et al.* 2011). Adicionalmente, a diversidade de agrupamentos fúngicos foi avaliada pela determinação da sua riqueza e abundância e os respectivos gráficos foram gerados no *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, 2018). O programa PAST3 (Hammer *et al.* 2001) foi usado para calcular as curvas de rarefação das amostras, bem como para estimar a riqueza ( $S$ ) e índices de diversidade [Índice de Diversidade de Simpson ( $1-D$ ) e índice de Shannon ( $H$ )]. As diferenças entre a riqueza e índices de diversidade de diferentes agrupamentos fúngicos foram averiguadas por testes de Tukey, realizados no *GraphPad Prism* 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Para comparar a similaridade entre agrupamentos da comunidade fúngica foram realizadas análises *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS) com o coeficiente de dissimilaridade Bray-Curtis, usando o *Community Package* 5.0 (CAP 5.0, Henderson & Seaby, 2014). Análises unilaterais de similaridade (ANOSIM) foram realizadas para determinar diferenças significativas entre agrupamentos de comunidades fúngicas usando matrizes de distância Bray-Curtis. Esta análise (ANOSIM) gera um valor de  $R$  (indica o grau de discriminação entre os grupos), que varia de 0 (indistinguível) a 1 (completamente diferente) e um valor de  $p$  (nível de significância abaixo de 0,05) (Clarke *et al.* 1993). Por fim, para se identificarem ASVs



exclusivos de determinadas condições foram gerados diagramas de *Venn* com o pacote *limma* usando o software *RStudio* (R Core Team, 2019).

### 3.3. Resultados e discussão

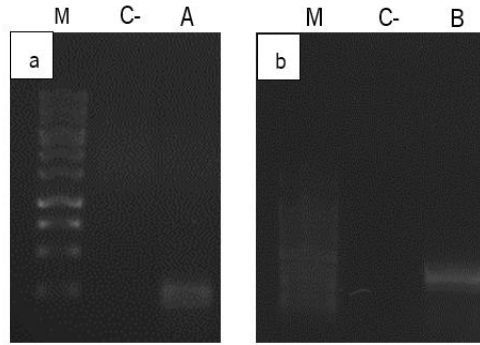
#### *Qualidade, quantidade e amplificação de DNA*

O processo de extração de DNA de epífitos e de endófitos foi otimizado, utilizando as azeitonas provenientes das amostras recolhidas. As otimizações levaram à escassez do material biológico das amostras dos endófitos 1.AC5, 1.PC5, 1.AM4, 1.AM5, 1.PM3, 1.PM4, 1.PM5 impedindo a extração de DNA das mesmas. Posto isto, para colmatar a falha das amostras mencionadas, foram preparadas amostras combinadas 1.AMm, 1.ACm e 1.PMm, que corresponderam à junção equitativa de material biológico proveniente das amostras (1.AM4+1.AM5), (1.AC1+1.AC3) e (1.PM2+1.PM3+1.PM6), respetivamente. Após a extração de DNA de todas as amostras, avaliou-se a sua concentração e pureza no espectrofotómetro NanoDrop (Tabela 5). Todas as amostras resultaram na extração de DNA, sendo que nalguns a concentração obtida foi muito reduzida (valores inferiores a 50 ng/µL assinalados em *itálico*). Todas as amostras, particularmente as dos epífitos, apresentaram um pico a 270 nm, indicando contaminação com fenol. Esta contaminação justifica a baixa pureza das amostras, avaliada pela reduzida razão A260/A230 (valores inferiores a 1,7 assinalados em *itálico*). As extrações das amostras de epífitos foram ainda muito inconsistentes, resultando em concentrações de DNA e contaminações muito variáveis (valores desde 1803,1 ng/µL a 1,8 ng/µL; desde 2,02 a 0,44 de A260/A280). Em comparação, a extração de DNA de amostras de tecido (endófitos) foi mais uniforme, resultando geralmente em concentrações elevadas e mais puras (valores desde 1924 ng/µL a 127,8 ng/µL; desde 2,07 a 1,61 de A260/A280).

De modo a avaliar a capacidade de amplificação do DNA, as regiões ITS1 (epífitos) e ITS2 (endófitos) foram amplificadas com os *primers* *ITS1F-ITS2* e *ITS3-ITS4*, respetivamente. A confirmação da amplificação foi avaliada por eletroforese (Figura 20). Todas as amostras endófiticas resultaram na amplificação de um fragmento com uma dimensão esperada, no entanto algumas amostras epifíticas não obtiveram qualquer amplificação (1.AM1-4, 1.PM1-3, 2.AM2, 2.PM2). Em qualquer dos casos, optou-se por enviar o DNA de todas as amostras (incluindo as não amplificadas) ao provedor de serviços de sequenciação, para preparação de bibliotecas ITS e sequenciação por *Illumina MiSeq*.

**Tabela 5.** Avaliação da quantidade (ng/μL) e qualidade (avaliada pelas razões A260/A230, A260/A280) do DNA extraído das amostras de epífitos e de endófitos da azeitona. Os valores em *itálico* assinalam os valores de concentrações abaixo de 50 ng/μL, enquanto os valores a sublinhado representam os valores de A260/A230 inferiores a 1,8.

		ng/μL	A260/280	A260/230	ng/μL	A260/280	A260/230			
Epífitos	Azeitonas verdes	Cobrançosa	1.AC1	58,7	0,68	<u>1,60</u>	1.PC1	462,7	2,09	2
			1.AC2	57,5	0,60	<u>1,39</u>	1.PC2	1058,0	1,60	2,02
			1.AC3	140,6	1,04	<u>1,59</u>	1.PC3	146,7	<u>1,14</u>	<u>1,61</u>
			1.AC4	<i>39,8</i>	0,37	<u>1,11</u>	1.PC4	60,4	<u>0,94</u>	<u>1,69</u>
			1.AC5	114,6	1,09	<u>1,37</u>	1.PC5	<i>1,8</i>	<u>0,07</u>	<u>0,44</u>
	Azeitonas maduras	Madural	1.AM1	<i>31,6</i>	0,11	1,81	1.PM1	779,2	1,38	<u>1,54</u>
			1.AM2	1803,1	1,90	<u>1,69</u>	1.PM2	64,9	0,34	<u>1,59</u>
			1.AM3	159,0	0,65	<u>1,64</u>	1.PM3	<i>10,9</i>	1,67	<u>1,51</u>
			1.AM4	<i>35,6</i>	0,17	<u>1,66</u>	1.PM4	450,1	1,27	<u>1,50</u>
			1.AM5	74,9	0,52	<u>1,31</u>	1.PM5	86,8	0,43	<u>1,62</u>
	Azeitonas semi-maduras	Cobrançosa	2.AC1	867,0	1,67	1,73	2.PC1	1034,2	2,16	1,70
			2.AC2	262,4	1,83	<u>1,59</u>	2.PC2	1020,2	1,65	<u>1,67</u>
			2.AC3	1213,9	1,70	2,02	2.PC3	1492,7	2,02	1,77
			2.AC4	90,2	1,65	<u>0,49</u>	2.PC4	1056,4	1,88	1,71
			2.AC5	528,4	2,17	2,30	2.PC5	463,4	1,44	2,01
Madural		2.AM1	102,5	1,72	<u>0,60</u>	2.PM1	1131,9	2,00	<u>1,69</u>	
		2.AM2	1393,2	1,66	1,89	2.PM2	1425,3	1,78	<u>1,57</u>	
		2.AM3	100,5	1,68	<u>0,84</u>	2.PM3	369,0	2,14	1,95	
		2.AM4	795,0	1,64	1,63	2.PM4	812,6	2,02	<u>1,68</u>	
		2.AM5	164,0	1,74	1,28	2.PM5	740,6	1,86	<u>1,64</u>	
Endófitos	Azeitonas verdes	Cobrançosa	1.AC1	311,2	1,58	1,91	1.PC1	395,6	1,58	1,86
			1.AC2	792,4	1,62	2,00	1.PC2	279,7	1,54	1,87
			1.AC3	927,1	1,59	1,89	1.PC3	815,1	1,83	2,04
			1.AC4	252,2	1,60	1,91	1.PC4	563,0	1,72	1,79
			1.ACm	356,5	1,62	1,72				
	Azeitonas maduras	Madural	1.AM1	268,0	1,40	1,89	1.PM1	407,6	1,65	1,73
			1.AM2	151,0	1,87	1,84	1.PM2	1924,0	2,03	<u>1,66</u>
			1.AM3	219,6	1,80	1,89	1.PMm	434,0	1,72	1,88
			1.AMm	433,4	1,74	1,87				
	Azeitonas semi-maduras	Cobrançosa	2.AC1	984,6	2,03	<u>1,67</u>	2.PC1	776,6	1,37	1,95
			2.AC2	564,8	1,67	1,91	2.PC2	462,3	1,25	1,84
			2.AC3	452,4	1,30	1,70	2.PC3	807,4	1,82	2,05
			2.AC4	445,9	1,71	1,93	2.PC4	127,8	1,38	<u>1,62</u>
			2.AC5	819,4	1,83	2,07	2.PC5	667,5	1,34	1,91
Madural		2.AM1	332,7	1,51	1,91	2.PM1	449,3	1,62	1,87	
		2.AM2	225,6	0,80	<u>1,61</u>	2.PM2	1068,3	1,62	1,99	
		2.AM3	758,4	1,46	1,97	2.PM3	1256,8	1,35	2,04	
		2.AM4	523,8	1,34	1,88	2.PM4	589,7	1,62	1,86	
		2.AM5	414,1	1,85	1,93	2.PM5	985,3	1,35	1,85	



**Figura 20.** Separação eletroforética representativa dos amplicões correspondentes às regiões ITS dos epífitos (a) e endófitos (b) isolados da oliveira. As regiões ITS foram amplificadas com os primers universais *ITS1-F/ITS2* (a) e *ITS3-ITS4* (b), sendo os produtos de PCR separados num gel de agarose (1%,p/v). A: Amplificação de DNA epifítico; B: Amplificação de DNA endofítico; C-: controle negativo, M: Marcador molecular 100 bp.

### ***Resultados de sequenciação e controlo de qualidade***

Todas as amostras enviadas foram sequenciadas com sucesso, com excepção das amostras de epífitos 1-PM1, 1-PM3 e 1-AM2, as quais já tinham revelado não serem amplificáveis, o que muito provavelmente sugere ausência/baixa concentração do respetivo DNA ou inibição da reação de PCR por contaminantes (provavelmente fenol). Um total de 3.448.414 *raw reads* de ITS2 foram geradas a partir de 72 amostras, as quais apresentaram uma variação de 109.464 a 302.946 *raw reads* por amostra (Tabela 6). Após aplicação dos vários filtros, as *reads* de elevada qualidade foram agrupadas num total de 1.350 SVs, incluídos em 2 filios de fungos, 9 classes, 22 ordens, 54 famílias, 68 gêneros e 28 espécies com mais de 97% de identidade. O reduzido número de espécies identificadas é justificado pela dificuldade em discriminar espécies filogeneticamente relacionadas através da região ITS, além da reduzida representação de fungos das bases de dados (Abdelfattah *et al.* 2015). Consequentemente, as ferramentas de bioinformática e os bancos de dados permitem uma relativa boa identificação de fungos até o nível do género, mas são menos fiáveis para identificar espécies. Isso é particularmente notório em membros do filo Ascomycota (o filo mais representado neste trabalho) (Abdelfattah *et al.* 2015).

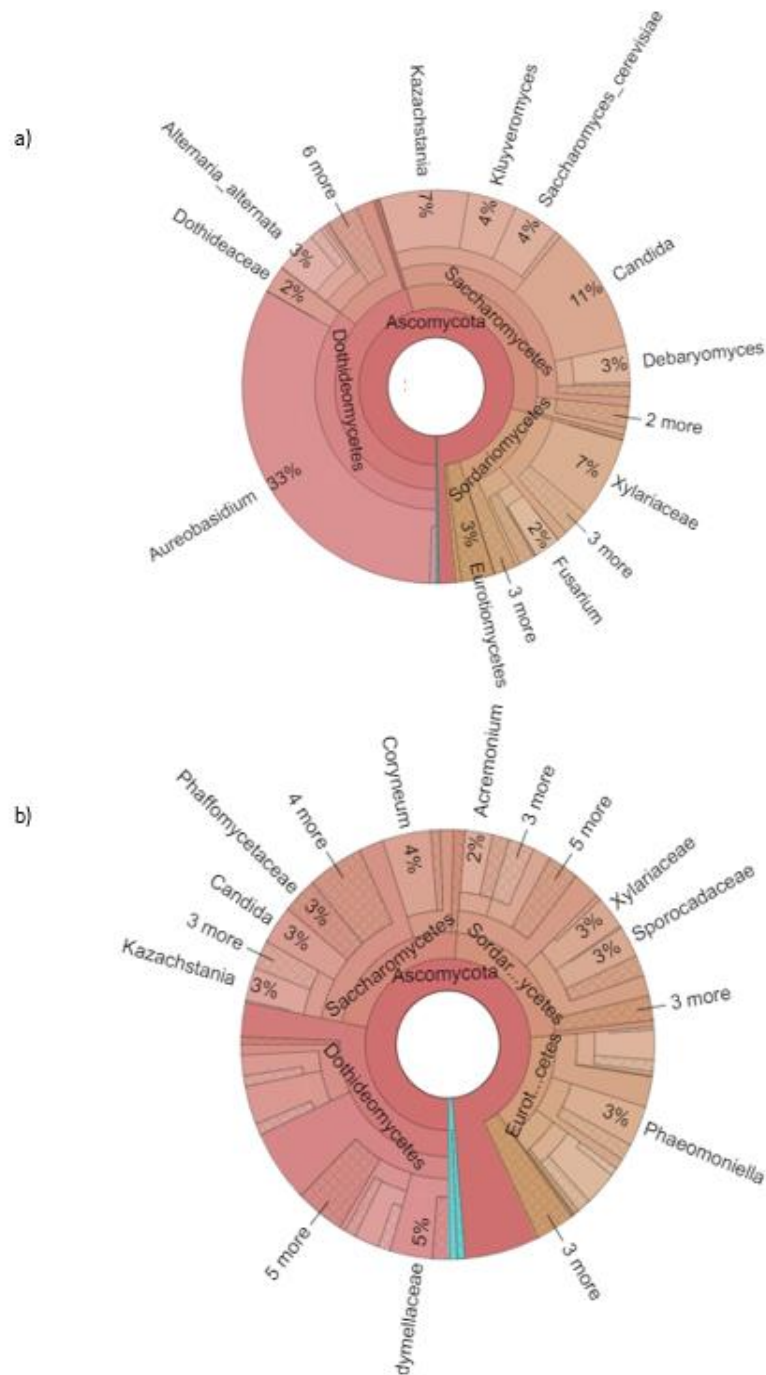
**Tabela 6.** Número de *raw reads* ITS2 em cada amostra, bem como o número de réplicas considerado e número de ASVs finais.

Fungos	Modo de produção	Índice de maturação	Cultivar	Nº de <i>reads</i> iniciais	ASVs	Nº de réplicas consideradas
Epífitos	Produção integrada	Verde	Madural	164.933	305	4
			Cobrançosa	215.910	272	5
		Semi-madura	Madural	302.947	193	5
			Cobrançosa	277.411	270	4
	Agricultura Biológica	Verde	Madural	109.464	95	3
			Cobrançosa	226.394	164	5
		Semi-madura	Madural	212.107	293	5
			Cobrançosa	223.574	164	5
Endófitos	Produção Integrada	Verde	Madural	173.677	294	4
			Cobrançosa	202.629	293	5
		Semi-madura	Madural	269.110	409	5
			Cobrançosa	262.060	296	5
	Agricultura Biológica	Verde	Madural	147.871	169	3
			Cobrançosa	177.115	165	4
		Semi-madura	Madural	221.438	388	5
			Cobrançosa	261.774	322	5
<b>TOTAL</b>				3.448.414	1.350	72

### *Análise global da comunidade fúngica epífita e endófitica da azeitona*

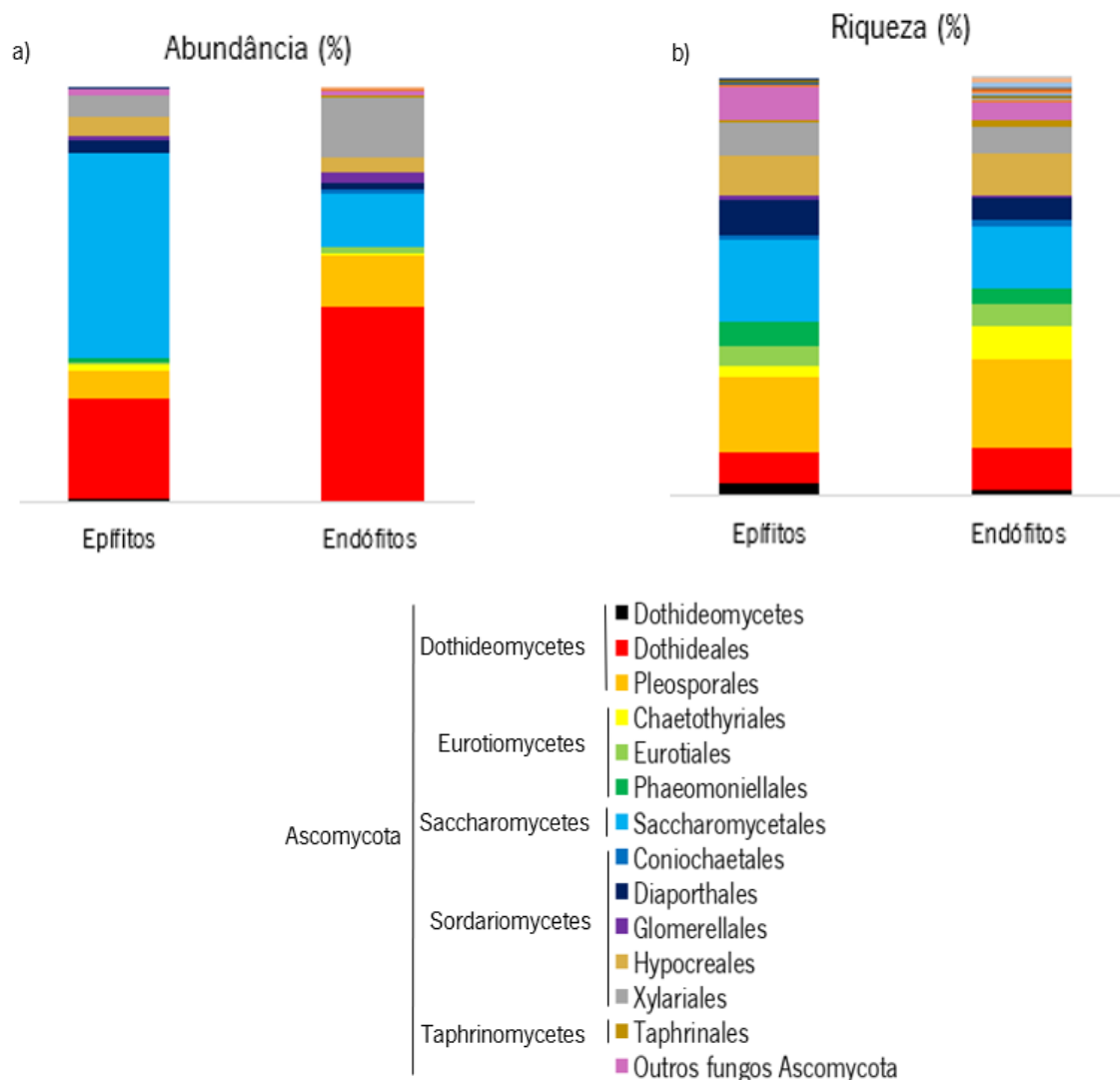
Neste trabalho procedeu-se ao isolamento e caracterização dos fungos da endosfera e episfera da azeitona, o que permitiu distinguir um total de 1.350 ASVs. A maioria das ASVs pertenceram ao filo Ascomycota (abundância relativa de 99,8%), sendo as restantes do filo Basidiomycota (abundância relativa de 0,2%) (Figura 21). Em 2015, Abdelfattah *et al.* já estudara a comunidade fúngica da azeitona, através de uma abordagem *metabarcoding*, obtendo abundâncias relativas semelhantes destes mesmos filos. As ASVs de Ascomycota identificadas no presente estudo pertencem principalmente a membros das classes Dothideomycetes (com 45% de abundância relativa), Saccharomycetes (34%) e Sordariomycetes (16%). Estas foram igualmente as classes mais ricas, representando 28%, 23% e 22% da riqueza fúngica total, respetivamente. As classes fúngicas Dothideomycetes, Sordariomycetes e Eurotiomycetes foram detetadas como as mais abundantes em azeitonas por Abdelfattah *et al.* (2015). Pelo contrário, a classe Saccharomycetes, e as classes menos abundantes Lecanoromycetes (com 0,3%

de abundância relativa), Taphrinomycetes (0,1%), Agaricomycetes (0,1%), Pezizomycetes (0,03%) e Leotiomycetes (0,02%), ainda não tinham sido detetadas em azeitonas através desta abordagem.



**Figura 21.** Abundância relativa (a) e riqueza (b) dos fungos isolados das azeitonas, considerando ambas as comunidades, a epifítica e a endofítica.

Apesar do elevado número de ASVs identificados, poucos gêneros foram responsáveis pela maioria das *reads*, sendo *Aureobasidium* o gênero mais abundante (com 33% de abundância relativa). A elevada abundância deste gênero na azeitona já era esperada, uma vez que foi abundantemente encontrado na azeitona por Abdelfattah *et al.* (2015). Este gênero é frequentemente descrito como não patogênico e já foi relatado como um agente de biocontrole eficaz, devido à sua atividade antagonista contra vários agentes fitopatogênicos (Nigro *et al.*, 2018). Neste trabalho, a comunidade endofítica e epifítica da azeitona serão caracterizadas separadamente, contrariamente ao estudo de Abdelfattah *et al.* (2015), estando a abundância relativa e riqueza das ordens fúngicas representadas na Figura 22.



**Figura 22.** Abundância relativa (a) e riqueza (b) das ordens fúngicas epifíticas e endofíticas associadas à azeitona. Ordens com abundância relativa e/ou riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.

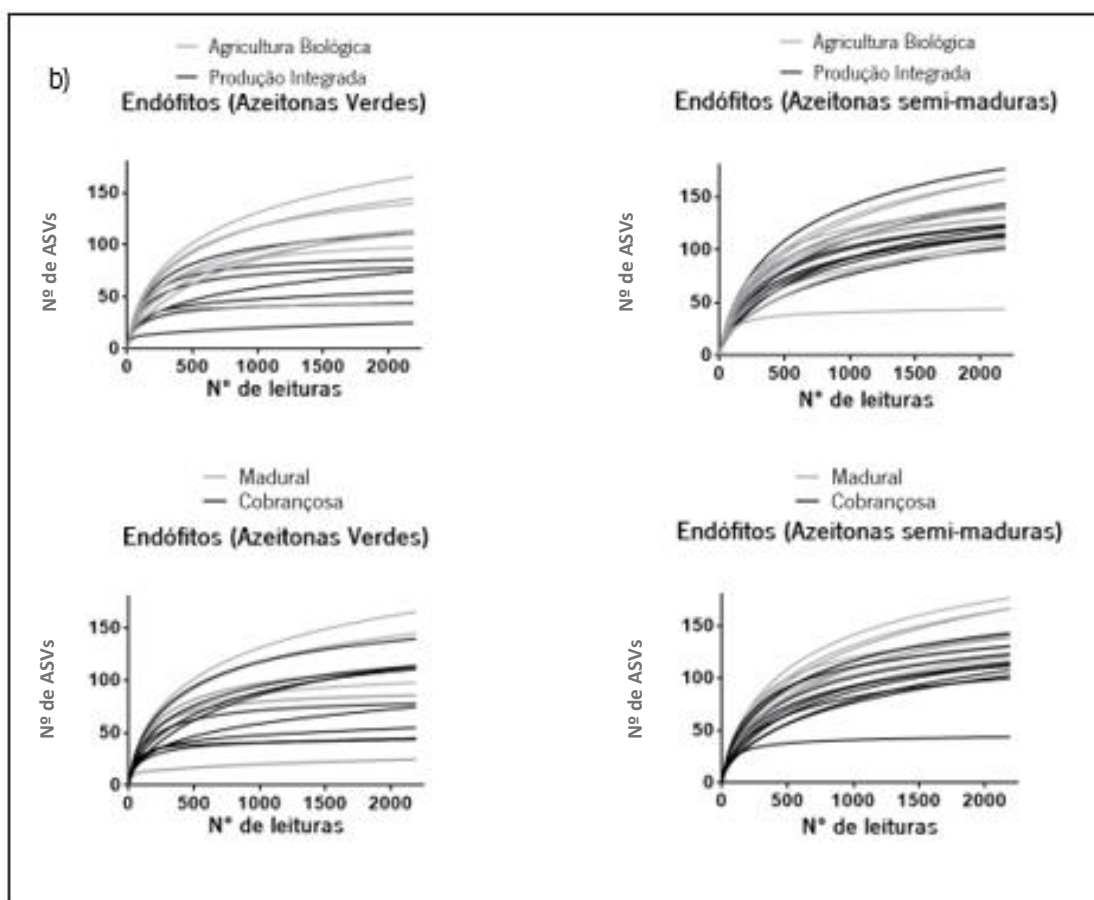
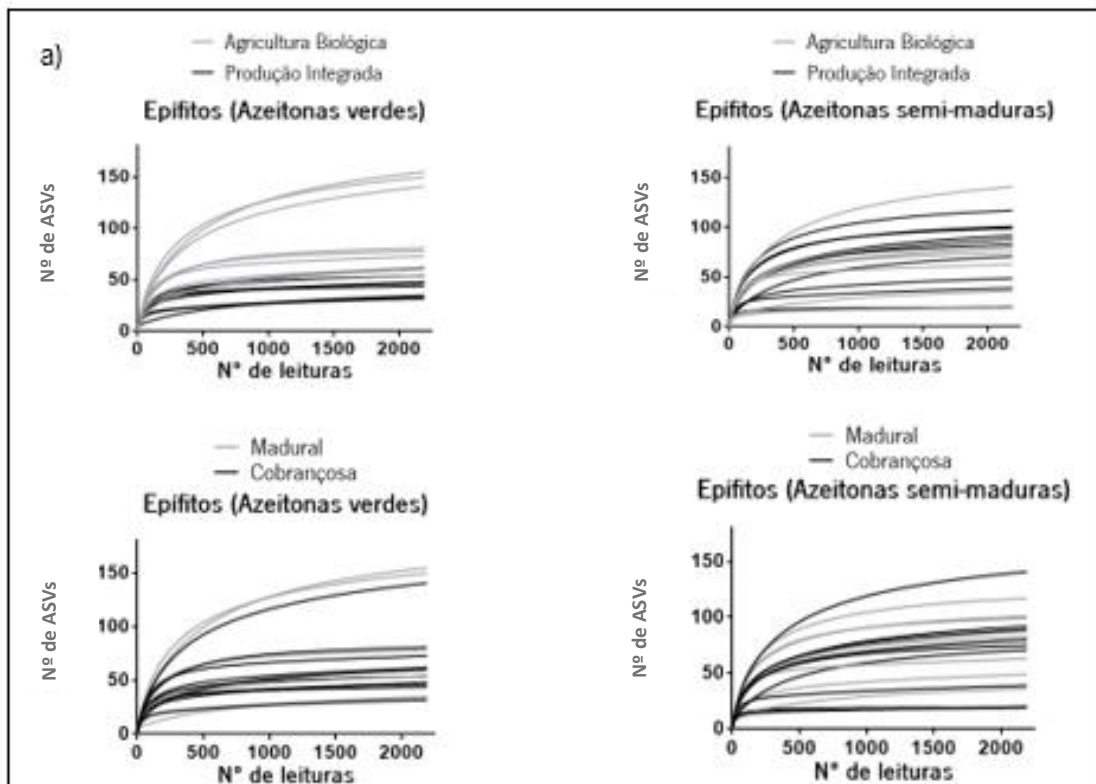
Na comunidade epifítica a ordem fúngica mais abundante foi Saccharomycetales (com 49% de abundância relativa), sendo também a mais rica (20% de riqueza). Já na comunidade endofítica, a ordem de maior abundância foi Dothideales (com 47% de abundância relativa), sendo Pleosporales a mais rica

(21% de riqueza). Verificou-se também que a comunidade endofítica e epifítica diferem mais ao nível da abundância relativa do que da riqueza das suas ordens, sendo Saccharomycetales a ordem mais distinta ao nível da abundância relativa (3 vezes mais abundante na comunidade epifítica comparativamente à endofítica). Chaetothyriales é a ordem que mais diferiu de riqueza entre as comunidades (2 vezes mais rica nos endófitos comparativamente aos epífitos).

A riqueza da comunidade fúngica epifítica e endofítica da azeitona foi igualmente avaliada através de curvas de rarefação, que representam a riqueza existente (número de ASVs), em função do número de *reads* obtidas (Figura 23). Estas curvas também permitem estimar a profundidade da amostragem. Quando a curva converge para uma assíntota horizontal (*plateau*), significa que um maior número de amostras (*reads* sequenciadas) não teria um efeito significativo no número detetado de ASVs, revelando uma adequada profundidade na amostragem.

Quase todas as curvas de rarefação relativas aos epífitos aparentam ter atingido o *plateau*, pelo que as comunidades microbianas epifíticas estão bem representadas (Figura 23.a). Por outro lado, grande parte das curvas de rarefação dos endófitos não atingiram o *plateau*, principalmente nas amostras provenientes de azeitonas semi-maduras (Figura 23.b), indicando que mais ASVs seriam identificadas com uma maior profundidade de sequenciação. Posto isto, podemos concluir que neste trabalho a comunidade fúngica epifítica está melhor representada do que a comunidade endofítica. Isto pode dever-se, pelo menos em parte, ao facto da extração de DNA ter incidido em grande parte no DNA da oliveira em vez de na sua comunidade fúngica.

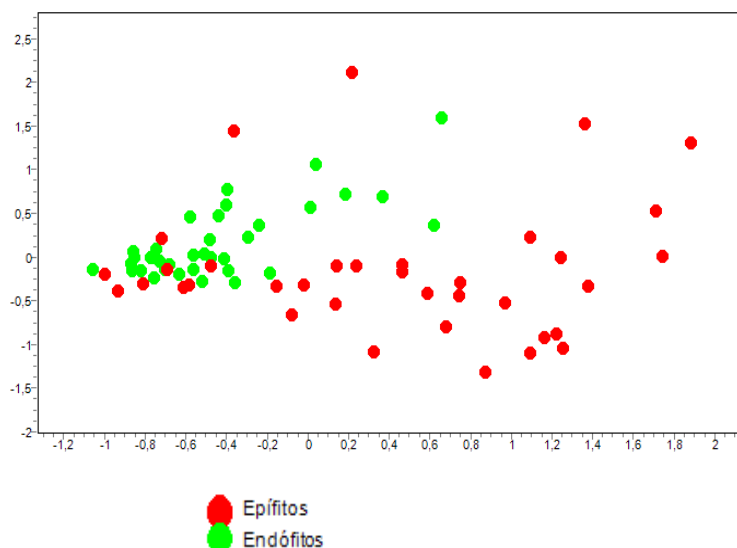
As curvas de rarefação das amostras epifíticas e endofíticas sugeriram que as azeitonas verdes provenientes de agricultura biológica apresentaram maior riqueza do que as provenientes de produção integrada. Isto pode dever-se ao facto de na agricultura biológica não serem usados produtos químicos, que limitem a riqueza fúngica, ao contrário do que acontece na produção integrada. Observando as curvas de rarefação dos endófitos, verifica-se uma maior riqueza fúngica nas azeitonas semi-maduras comparativamente às verdes. Já em 2015, Abdelfattah *et al.* verificou que o número de *taxa* fúngicos em azeitonas variou de 44 (em azeitonas colhidas em junho) para 88 (em azeitonas colhidas em dezembro), refletindo um aumento da riqueza fúngica endofítica da azeitona ao longo da sua maturação. No presente trabalho, verificou-se ainda uma maior riqueza fúngica nas azeitonas semi-maduras provenientes da cv. Madural, comparativamente à cv. Cobrançosa. Este resultado sugere que o genótipo do hospedeiro, a nível do cultivar, modela a riqueza da comunidade fúngica endofítica da azeitona como já fora reportado para outros órgãos da oliveira por Costa *et al.* (2019).



**Figura 23.** Curvas de rarefação para as amostras fúngicas epifíticas (a) e endofíticas (b) da azeitona, tendo em consideração aquelas obtidas para azeitonas verdes ou semi-maduras, ou para a cv. Madural ou cv. Cobrançosa. As curvas de rarefação foram obtidas no software Past3 v3.26.



De um modo geral, as curvas de rarefação sugeriram que as amostras estavam bem representadas e que as amostras endofíticas apresentavam uma maior riqueza do que as epifíticas. As diferenças entre as comunidades foram também avaliadas recorrendo a uma análise *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS), com base no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, que tem em consideração a abundância (Figura 24).



**Figura 24.** Análise Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) para verificação do agrupamento das comunidades fúngicas endofíticas e epifíticas pelo coeficiente de Bray-Curtis (2D Stress = 0,18).

A análise de agrupamento NMDS resultou numa boa representação das comunidades fúngicas endofíticas e epifíticas da azeitona (2D Stress  $\leq$  0,2 (Figura 24). Verificou-se também uma maior dispersão das amostras dos epifitos, comparativamente às amostras dos endófitos, o que era previsível, uma vez que os endófitos são protegidos das condições ambientais pelos tecidos das plantas, encontrando-se num ambiente mais constante. Para verificar a dissimilaridade entre a comunidade epifítica e endofítica da azeitona foi realizada uma análise de similaridade (ANOSIM), concluindo-se que a comunidade endofítica e epifítica são significativamente diferentes em termos de composição de espécies (ANOSIM,  $R=0,28$ ,  $p=0,001$ ). Posto isto, podemos concluir que a comunidade fúngica endofítica e epifítica da azeitona são distintas, ao nível da sua composição. Um resultado semelhante foi verificado para as respetivas comunidades das folhas da árvore em estudo, a oliveira (Gomes *et al.* 2018).

#### ***Comparação da comunidade fúngica de azeitonas em diferentes estados de maturação, modos de produção e cultivares***

As azeitonas consideradas neste estudo têm sido descritas como apresentando diferente suscetibilidade à doença da gafa (Cordeiro *et al.* 2011). As azeitonas verdes, tal como as provenientes

de produção integrada e da cv. Cobrançosa são menos suscetíveis à doença, comparativamente às semi-maduras, provenientes de agricultura biológica e da cv. Madural, respetivamente. Neste subcapítulo, procurou-se compreender de que forma a comunidade fúngica da azeitona se relaciona com a tolerância à doença. Nesse seguimento, foram averiguadas as diferenças ao nível da riqueza e composição da comunidade fúngica de azeitonas de diferentes estados de maturação, modos de produção e cultivar. A riqueza ( $S$ , número total de ASVs) é a medida mais simples de diversidade observada numa comunidade, podendo ser adicionalmente avaliada através do cálculo de índices de diversidade. Os índices mais usados são o índice de Shannon ( $H$ ) e o índice Simpson ( $1-D$ ), que têm em consideração para além da riqueza as abundâncias de espécies. A diversidade das diferentes comunidades fúngicas foi então comparada através da riqueza ( $S$ ) e índices diversidade [Simpson ( $1-D$ ) e Shannon ( $H$ )] (Tabela 7).

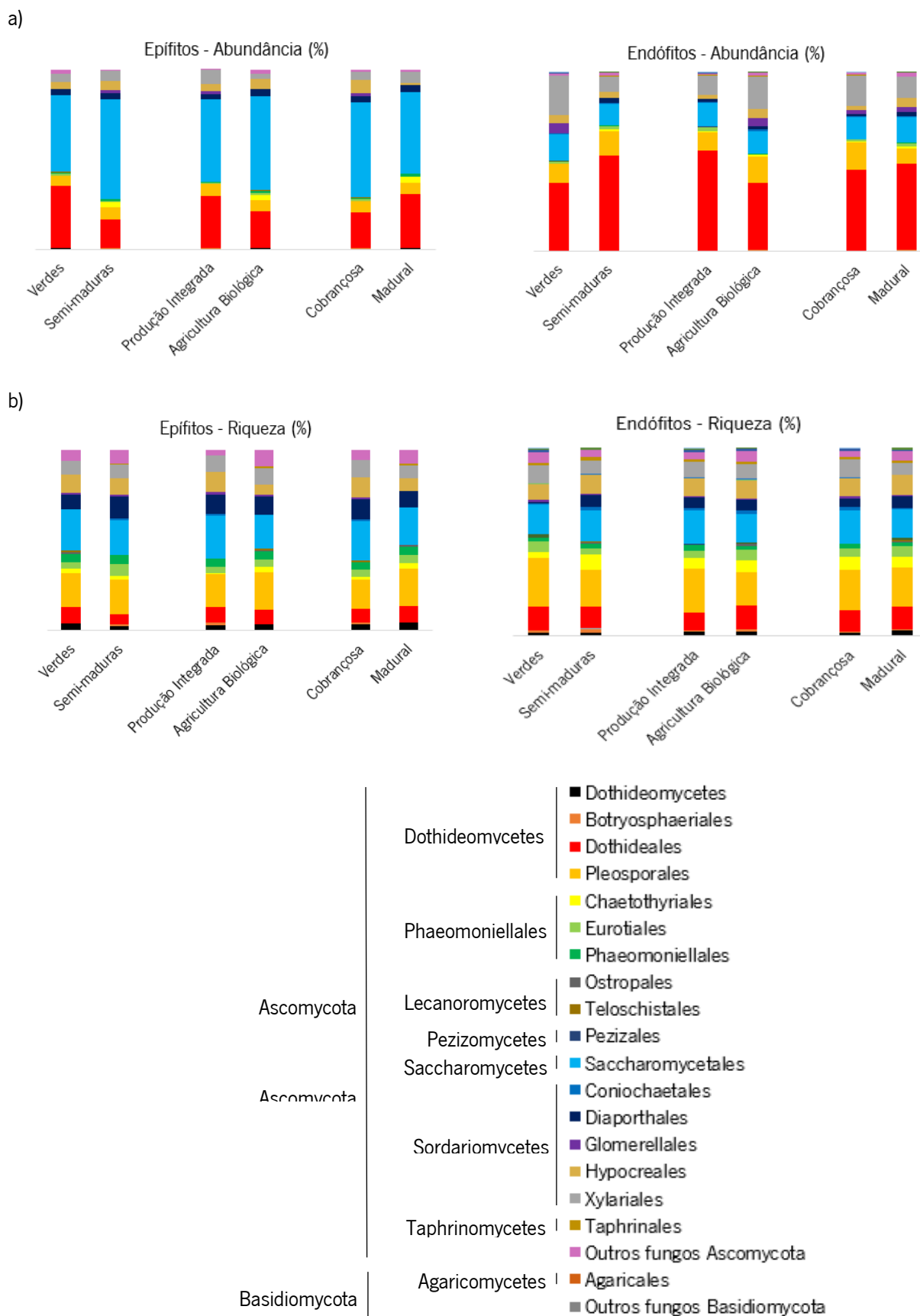
A riqueza da comunidade fúngica total da azeitona variou significativamente entre os estados de maturação, modos de produção e cultivares estudados. As azeitonas verdes apresentaram uma menor riqueza da comunidade fúngica total, comparativamente às azeitonas semi-maduras, sendo que apenas a riqueza da comunidade endofítica variou significativamente entre os estados de maturação. Estes resultados sugerem que o estado de maturação tem um maior impacto na riqueza da comunidade fúngica endofítica do que na epifítica. De acordo com a tabela 7, as azeitonas provenientes de agricultura biológica apresentaram maior riqueza a nível da comunidade fúngica endofítica e epifítica do que as provenientes de produção integrada. Este resultado indica que o modo de produção afeta tanto a comunidade endofítica como a epifítica da azeitona. Por fim, a comparação da riqueza entre cultivares de oliveira revelou que a cv. Madural apresentou maior riqueza da comunidade fúngica total da azeitona do que cv. Cobrançosa, contudo apenas a comunidade endofítica foi afetada significativamente. Estes resultados são corroborados pelas curvas de rarefação representadas na figura 23. Os índices de diversidade ( $1-D$  e  $H$ ) não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os estados de maturação das azeitonas, modos de produção ou cultivares. No entanto, estes fatores afetam a riqueza da comunidade fúngica da azeitona, sendo que no geral têm maior impacto na comunidade fúngica endofítica do que na epifítica. Indicam ainda que o fator 'modo de produção' é o que mais afeta a riqueza da comunidade fúngica da azeitona. Posto isto, podemos concluir que a riqueza da comunidade fúngica endofítica e epifítica não é modelada igualmente pelos mesmos fatores, o que já fora verificado em folhas da oliveira (Gomes *et al.*, 2018). Uma vez que se verificaram diferenças significativas ao nível da riqueza das comunidades fúngicas, uma análise mais detalhada da estrutura e composição das comunidades será posteriormente apresentada.

A abundância relativa e riqueza das ordens fúngicas endofíticas e epifíticas da azeitona foi comparada entre estados de maturação, modos de produção e cultivares da oliveira (Figura 25).

**Tabela 7.** Riqueza fúngica (*S*) e índices de diversidade [Simpson (*1-D*) e Shannon (*H'*)] das amostras epifíticas e endofíticas de azeitonas com diferentes estados de maturação, provenientes de modos de produção e cultivares distintos. Os resultados são representados pelo valor médio ± DP. Letras sobrescritas denotam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), onde as letras maiúsculas (A-B) se referem à diferença entre epífitos e endófitos e as minúsculas (a-b) entre os estados de maturação/modo de produção/cultivar. As diferenças significativas estão destacadas a negrito.

	<b>Maturação</b>					
	Verdes			Semi-maduras		
	<i>S</i>	<i>H'</i>	1- <i>D</i>	<i>S</i>	<i>H'</i>	1- <i>D</i>
Epífitos	<b>71,1±29,5<sup>Aa</sup></b>	3,1±0,4 <sup>Aa</sup>	0,9±0,02 <sup>Aa</sup>	<b>71,7±26,9<sup>Aa</sup></b>	3,1±0,5 <sup>Aa</sup>	0,9±0,04 <sup>Aa</sup>
Endófitos	<b>93,8±33,1<sup>Ba</sup></b>	3,3±0,4 <sup>Aa</sup>	0,9±0,03 <sup>Aa</sup>	<b>127,2±20,7<sup>Bb</sup></b>	3,3±0,3 <sup>Aa</sup>	0,9±0,02 <sup>Aa</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>81,7±34,3<sup>a</sup></b>	3,2±0,4 <sup>a</sup>	0,9±0,02 <sup>a</sup>	<b>100,1±33,6<sup>b</sup></b>	3,2±0,4 <sup>a</sup>	0,9±0,03 <sup>a</sup>
	<b>Modo de produção</b>					
	Agricultura Biológica			Produção integrada		
	<i>S</i>	<i>H'</i>	1- <i>D</i>	<i>S</i>	<i>H'</i>	1- <i>D</i>
Epífitos	<b>81,3±29,0<sup>Aa</sup></b>	3,2±0,4 <sup>Aa</sup>	0,9±0,03 <sup>Aa</sup>	<b>65,3±23,8<sup>Ab</sup></b>	3,0±0,4 <sup>Aa</sup>	0,9±0,04 <sup>Aa</sup>
Endófitos	<b>122,2±27,1<sup>Ba</sup></b>	3,5±0,3 <sup>Aa</sup>	0,9±0,02 <sup>Aa</sup>	<b>102,9±29,9<sup>Bb</sup></b>	3,1±0,3 <sup>Aa</sup>	0,9±0,03 <sup>Aa</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>101,2±36,6<sup>a</sup></b>	3,3±0,3 <sup>a</sup>	0,9±0,03 <sup>a</sup>	<b>81,6±33,9<sup>b</sup></b>	3,1±0,4 <sup>a</sup>	0,9±0,03 <sup>a</sup>
	<b>Cultivar</b>					
	Madural			Cobrançosa		
	<i>S</i>	<i>H'</i>	1- <i>D</i>	<i>S</i>	<i>H'</i>	1- <i>D</i>
Epífitos	<b>76,7±30,6<sup>Aa</sup></b>	3,2±0,5 <sup>Aa</sup>	0,9±0,04 <sup>Aa</sup>	<b>66,7±25,5<sup>Aa</sup></b>	3,1±0,3 <sup>Aa</sup>	0,9±0,03 <sup>Aa</sup>
Endófitos	<b>130,0±26,9<sup>Ba</sup></b>	3,5±2,3 <sup>Aa</sup>	0,9±0,02 <sup>Aa</sup>	<b>98,4±26,2<sup>Bb</sup></b>	3,2±0,3 <sup>Aa</sup>	0,9±0,02 <sup>Aa</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>102,5±39,5<sup>a</sup></b>	3,3±0,4 <sup>a</sup>	0,9±0,03 <sup>a</sup>	<b>82,5±30,9<sup>b</sup></b>	3,1±0,3 <sup>a</sup>	0,9±0,03 <sup>a</sup>

Como já evidenciado aquando da avaliação da comunidade fúngica global da azeitona, Saccharomycetales foi a ordem mais abundante da comunidade epifítica da azeitona, independentemente do seu estado de maturação, modo de produção e cultivar. A abundância relativa desta ordem variou entre 42% em azeitonas verdes e 55% em azeitonas semi-maduras. Foi também a ordem mais rica na comunidade epifítica em todas as condições testadas, excetuando na cv. Madural (onde tanto Saccharomycetales quanto Pleosporales representaram 21% da riqueza total) e na agricultura biológica (onde a ordem mais rica foi Pleosporales, representando 21% da riqueza total). Nas restantes condições, a riqueza da ordem Saccharomycetales variou entre 19% nas azeitonas semi-maduras e 24% nas azeitonas provenientes de produção integrada.



**Figura 25.** Abundâncias relativas (a) e riqueza (b) das ordens fúngicas endófitas e epifíticas associadas a azeitonas provenientes de diferentes estados de maturação, modos de produção e cultivares, revelada por *metabarcoding*. Ordens com abundância relativa e/ou riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.

Tal como previamente discutido aquando da avaliação da comunidade fúngica global, a ordem fúngica mais abundante na endosfera da azeitona foi Dothideales, independente do estado de maturação, modo de produção e cultivar, variando entre 38% (em azeitonas verdes e azeitonas provenientes de agricultura biológica) e 56% (em azeitonas provenientes de produção integrada). Independentemente da proveniência, Pleosporales foi a ordem mais rica da endosfera da azeitona, sendo as azeitonas produzidas por agricultura biológica as que apresentam a menor riqueza desta ordem (18% da riqueza total) e as azeitonas verdes a maior riqueza (25%).

A comunidade fúngica epifítica das azeitonas verdes diferiu da comunidade das semi-maduras, sobretudo ao nível da ordem Saccharomycetales. A sua abundância relativa aumentou 1,3 vezes das azeitonas verdes para semi-maduras. A nível da riqueza a maior variação verificou-se na ordem Dothideales, que apresentou uma redução de 0.6 vezes das azeitonas verdes para as semi-maduras. Na comunidade endofítica das azeitonas verdes, Dothideales representou 37% da abundância total e nas semi-maduras 53%, sendo a ordem que mais variou entre estados de maturação, apresentando um aumento em abundância de 1,4 vezes com a maturação. A riqueza desta comunidade verificou uma variação, sobretudo na ordem Pleosporales, que representou 25% da riqueza total nas azeitonas verdes descendo para 19% em azeitonas semi-maduras (diminuição de 0,76 vezes).

O modo de produção afetou maioritariamente a abundância relativa da ordem Dothideales na comunidade epifítica. Esta ordem apresentou uma redução de 0,45 vezes na abundância relativa, quando comparando azeitonas provenientes de um modo de produção integrada (29%) com as de agricultura biológica (20%). A riqueza da comunidade fúngica epifítica sofreu a sua maior variação ao nível da ordem Hypocreales, apresentando uma riqueza 2,2 vezes superior em azeitonas provenientes de produção integrada (11% da riqueza total) do que em azeitonas biológicas (5%). Tal como na comunidade fúngica epifítica, na endofítica verificou-se a maior oscilação da abundância relativa na ordem Dothideales. Esta ordem foi aquela que apresentou uma maior redução (0,67 vezes), comparando azeitonas provenientes de produção biológica (55%) com azeitonas biológicas (37%). Ao nível da riqueza, Pleosporales foi a ordem que mais contribuiu para a diferença da comunidade endofítica, apresentando uma redução de 0,74 vezes das azeitonas provenientes de produção integrada (23%) para as biológicas (17%).

A cultivar afetou maioritariamente a abundância relativa da ordem Dothideales na comunidade fúngica epifítica, sendo esta 2,9 vezes mais abundante na cv. Madural (29% da abundância total) do que em cv. Cobraçosa (10%). Ao nível da riqueza, a ordem mais afetada foi Pleosporales, sendo 1,25 vezes mais rica na cv. Madural (20% da riqueza total) do que na cv. Cobraçosa (16%). A ordem Pleosporales foi também a que sofreu uma maior variação da abundância ao nível da comunidade fúngica endofítica entre as cultivares, sendo 1,87 mais abundante na cv. Cobraçosa (15%) comparativamente à cv. Madural

(15%). Ao nível da riqueza, Xylariales foi a ordem que mais variou entre os endófitos, sendo 1,5 vezes mais rica na cv. Cobrançosa relativamente à cv. Madural (6%).

Estes resultados sugerem que o estado de maturação, modo de produção e cultivar têm um maior impacto ao nível da abundância relativa das ordens fúngicas do que na sua riqueza, sendo a abundância da ordem Dothideales a principalmente afetada pelos fatores em estudo. Deste modo, foram realizados testes estatísticos (ANOSIM) com base no índice de Bray-Curtis para verificar se a estrutura da comunidade fúngica da azeitona varia significativamente entre estados de maturação, modos de produção e cultivares (Tabela 8).

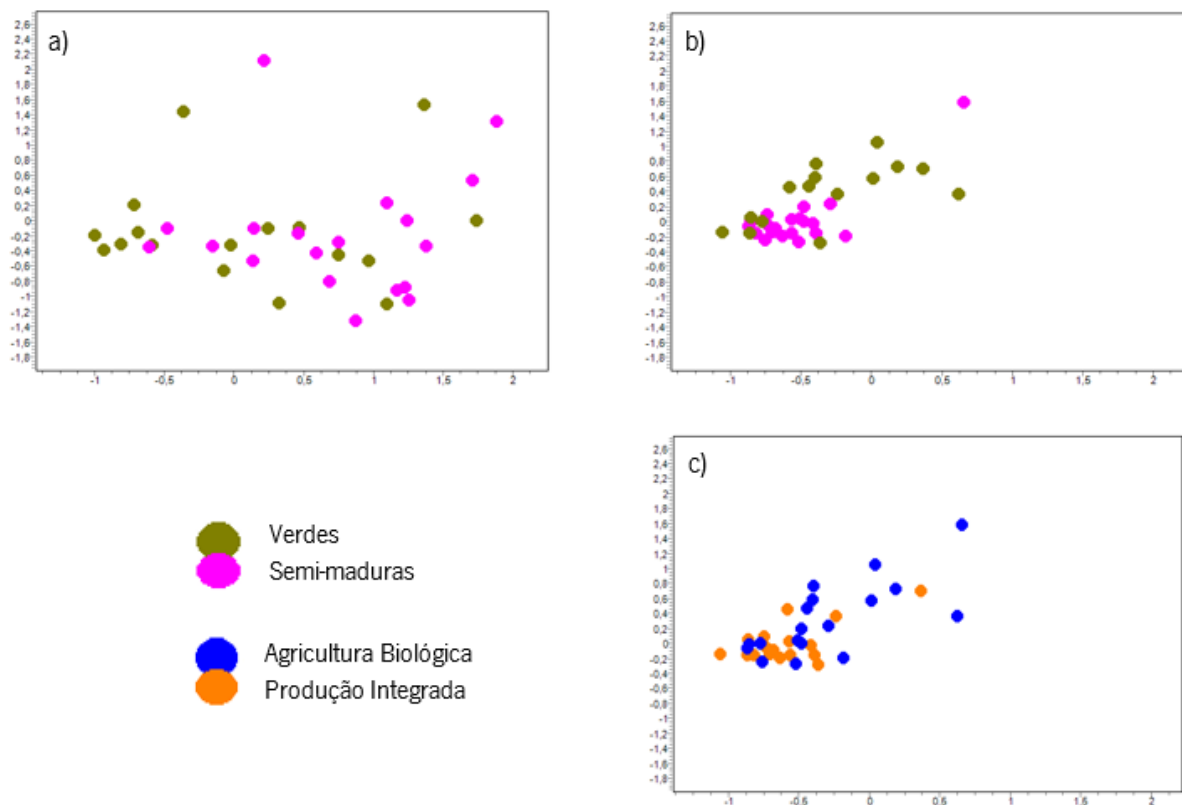
**Tabela 8.** Resultados do teste estatístico ANOSIM com base no índice de Bray-Curtis para a comunidade fúngica epifítica, endofítica e total da azeitona. Os resultados são representados pelo valor de  $R$  e  $p$ . As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão destacadas a negrito.

	Estado de Maturação	Modo de Produção	Cultivar
Epifitos	$R=0.07$ $p=0.04$	$R=0.004$ $p=0.47$	$R=0.005$ $p=0.48$
Endófitos	$R=0.29$ $p=0.001$	$R=0.11$ $p=0.005$	$R=0.009$ $p=0.52$
TOTAL	$R=0.02$ $p=0.12$	$R=0.01$ $p=0.28$	$R=0.01$ $p=0.76$

De acordo com os resultados da tabela 8, o único fator que contribuiu significativamente para a variação da estrutura da comunidade fúngica epifítica foi o ‘estado de maturação’ (ANOSIM,  $R=0,07$ ,  $p=0,04$ ). Já a estrutura da comunidade endofítica foi afetada significativamente pelo estado de maturação (ANOSIM,  $R=0,29$ ,  $p=0,001$ ) e modo de produção (ANOSIM,  $R=0,11$ ,  $p=0,005$ ). Apesar disso, nenhum dos fatores testados contribuiu significativamente para a estrutura da comunidade fúngica total da azeitona. Estes resultados permitem inferir que os fatores testados neste trabalho (estado de maturação, modo de produção e cultivar) têm maior impacto na estrutura da comunidade fúngica endofítica da azeitona do que na epifítica. Verifica-se igualmente que o estado de maturação é, dos fatores testados, o que mais influencia a estruturação da comunidade fúngica da azeitona. Estes resultados foram complementados com as respetivas análises *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS), com base no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 26).

Nos gráficos NMDS verificou-se uma maior dispersão nas amostras epifíticas (Figura 26.a) relativamente às endofíticas (Figura 26.b,c), o que já era esperado tendo em conta os resultados presentes na figura 24. Não se verificaram agrupamentos evidentes na comunidade epifítica (Figura 26.a), o que corrobora o baixo valor  $R$  obtido na análise ANOSIM ( $R=0,07$ ,  $p=0,04$ ). Analisando a comunidade fúngica endofítica, as azeitonas verdes apresentam comunidades mais distintas entre si do que as das semi-maduras. Aquando da colheita das azeitonas semi-maduras, a disponibilidade de azeitonas aparentemente sãs foi muito reduzida, pelo que grande parte das azeitonas apresentava

sintomatologia da gafa. Isto pode justificar, pelo menos em parte, o facto das azeitonas semi-maduras apresentarem uma comunidade fúngica mais idêntica entre si do que as verdes (Figura 26.b). Também na comunidade fúngica endofítica das azeitonas provenientes de agricultura biológica se verificou maior heterogeneidade na estrutura das comunidades, do que nas provenientes de produção integrada (Figura 26.c). Isto deve-se, possivelmente, ao facto de em produção integrada serem usados produtos químicos que condicionam a comunidade fúngica da azeitona, o que não acontece em agricultura biológica. De realçar ainda que os agrupamentos entre as comunidades endofíticas de azeitonas com diferentes estados de maturação são mais evidentes do que entre modos de produção, o que é corroborado pelo maior valor de  $R$  obtido na análise ANOSIM relativo ao estado de maturação ( $R = 0,11$ ,  $p = 0,005$ ) em comparação com o modo de produção ( $R = 0,29$ ,  $p = 0,001$ ).



**Figura 26.** Análises Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) para verificação do agrupamento das comunidades fúngicas epifíticas (a) e endofíticas (b,c) pelo coeficiente de Bray-Curtis (2D Stress = 0,18).

### *Grupos fúngicos potencialmente envolvidos na suscetibilidade e tolerância das oliveiras à doença da gafa*

No subcapítulo anterior, verificou-se que o estado da maturação, modo de produção e cultivar da oliveira afetam a riqueza e/ou estrutura da comunidade fúngica endofítica e/ou epifítica da azeitona. Assim sendo, neste capítulo será analisada de que forma a riqueza e estrutura da comunidade fúngica se relacionam com a suscetibilidade das azeitonas à doença da gafa, a fim de detetar grupos fúngicos relevantes para a fitossanidade da oliveira. O estado de maturação, modo de produção e cultivar para

além de afetarem a riqueza fúngica endofítica e/ou epifítica da azeitona afetaram também significativamente a riqueza fúngica total presente nas azeitonas. Posto isto, analisou-se detalhadamente as variações da riqueza na comunidade fúngica endofítica e epifítica da azeitona (Tabela 9).

**Tabela 9.** Riqueza fúngica (*S*) das amostras epifíticas e endofíticas da azeitona, provenientes de estados de maturação, modos de produção e cultivares diferentes. Os resultados são representados pelo valor médio  $\pm$  DP. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão evidenciadas por: letras maiúsculas sobrescritas (A-B) quanto aos modos de produção, letras minúsculas sobrescritas (a-b) quanto aos estados de maturação, e letras gregas sobrescritas ( $\alpha$ - $\beta$ ) quanto aos cultivares.

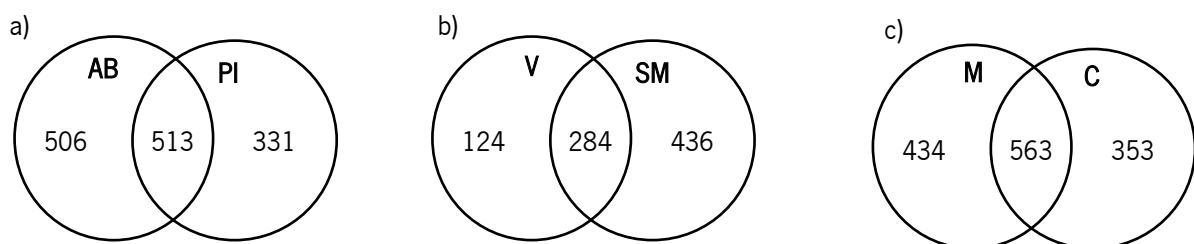
		Verdes	Semi-maduras	
		<i>S</i>	<i>S</i>	
Epífitos	Agricultura biológica	Madural	109,2 $\pm$ 44,1 <sup>Aa<math>\alpha</math></sup>	57,0 $\pm$ 25,5 <sup>Ab<math>\alpha</math></sup>
		Cobrançosa	83,8 $\pm$ 29,5 <sup>Aa<math>\alpha</math></sup>	80,8 $\pm$ 38,8 <sup>Aa<math>\alpha</math></sup>
	Produção integrada	Madural	43,3 $\pm$ 13,2 <sup>Ba<math>\alpha</math></sup>	89,8 $\pm$ 23,0 <sup>Bb<math>\alpha</math></sup>
		Cobrançosa	45,0 $\pm$ 7,2 <sup>Ba<math>\alpha</math></sup>	55,5 $\pm$ 27,8 <sup>Aa<math>\beta</math></sup>
Endófitos	Agricultura biológica	Madural	152,0 $\pm$ 9,8 <sup>Aa<math>\alpha</math></sup>	148,4 $\pm$ 15,5 <sup>Aa<math>\alpha</math></sup>
		Cobrançosa	104,8 $\pm$ 31,6 <sup>Aa<math>\beta</math></sup>	105,2 $\pm$ 34,2 <sup>Aa<math>\beta</math></sup>
	Produção integrada	Madural	74,0 $\pm$ 36,1 <sup>Ba<math>\alpha</math></sup>	141,6 $\pm$ 19,9 <sup>Ab<math>\alpha</math></sup>
		Cobrançosa	63,0 $\pm$ 14,0 <sup>Ba<math>\alpha</math></sup>	113,6 $\pm$ 6,4 <sup>Ab<math>\beta</math></sup>

Os resultados revelaram que a comunidade fúngica epifítica e endofítica é mais rica em azeitonas verdes de agricultura biológica, do que em azeitonas verdes de produção integrada. De modo a compreender as diferenças entre a riqueza fúngica em azeitonas verdes de ambos os modos de produção realizou-se um diagrama de Venn (Figura 27.a), que revelou a existência de 506 ASVs exclusivas da comunidade fúngica das azeitonas verdes biológicas e 331 ASVs exclusivas das azeitonas verdes provenientes da produção integrada. As ASVs exclusivas da agricultura biológica e da produção integrada foram classificadas quando à sua ordem fúngica e representadas percentualmente na figura 28.

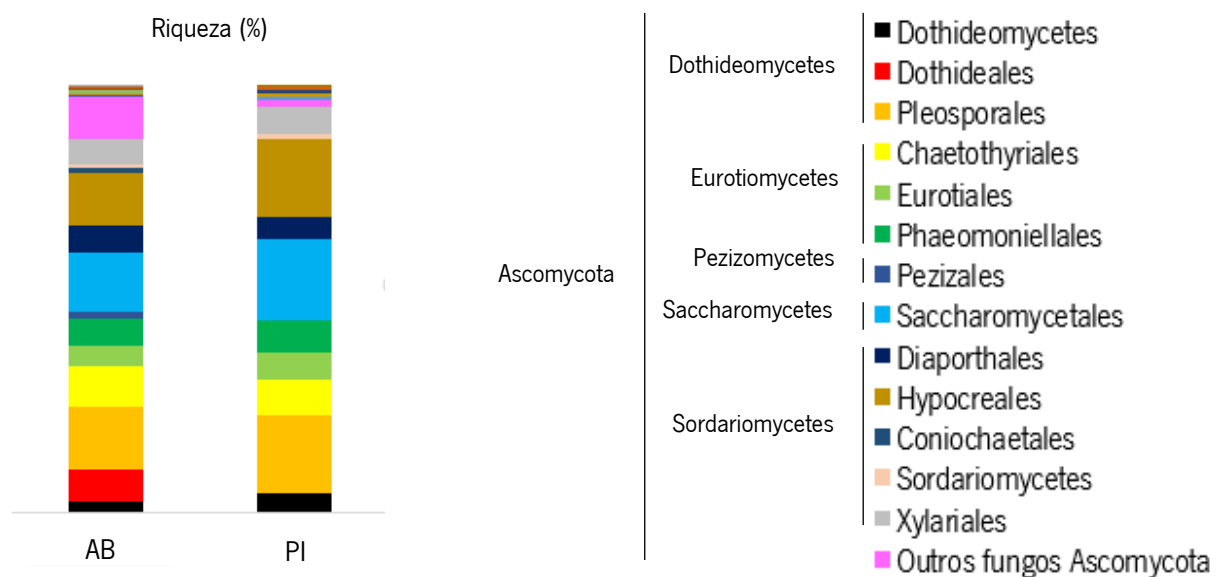
As riquezas exclusivas de cada modo de produção diferiram entre si principalmente ao nível da ordem Dothideales (Figura 28). Esta ordem representou 7,2% da riqueza exclusiva de agricultura biológica e apenas 0,3% da riqueza exclusiva de produção integrada. Sabe-se que Dothideales é uma das maiores ordens de fungos fitopatogénicos (Callan & Carris, 2004), pelo que, a sua maior incidência em azeitonas biológicas poderá estar associada à maior suscetibilidade destas azeitonas à doença da gafa. As ASVs Dothideales exclusivas de agricultura biológica consistiram em *Aureobasidium* spp. (27%), *Aureobasidium*



*pullulans* (23%), *Hormonema* spp. (15%), Dothideaceae (15%) outros Dothideales (12%) e *Pseudoseptoria* spp. (8%) (anexo 3). Apesar de 50% dos membros da ordem Dothideales exclusivos de agricultura biológica consistirem em *Aureobasidium* spp., um género frequentemente descrito como não patogénico, esta ordem também incluiu membros fitopatogénicos como *Pseudoseptoria* spp. (Carmona *et al.* 1996). Também a abundância do agente causador da doença da gafa (*Colletotrichum* spp., ordem Glomerellales da classe Sordariomycetes) foi duas vezes maior em azeitonas verdes biológicas (2,2% de abundância relativa) do que naquelas provenientes de produção integrada (1,1%). Este resultado está de acordo com a maior suscetibilidade à gafa das azeitonas biológicas, comparativamente às de produção integrada. A maior suscetibilidade em agricultura biológica pode dever-se ao facto de não serem utilizados químicos, permitindo assim a maior estabilização no microbioma da oliveira de espécies prejudiciais à sua fitossanidade (potencialmente membros Dothideales, mas também dos agentes causadores da doença da gafa).



**Figura 27.** Diagrama de Venn com as ASVs exclusivas e compartilhadas entre a comunidade fúngica: (a) das azeitonas verdes de agricultura biológica (AB) e de produção integrada (PI); (b) das azeitonas verdes (V) e semi-maduras (SM) de produção integrada; (c) das azeitona Madural (M) e Cobrançosa (C).



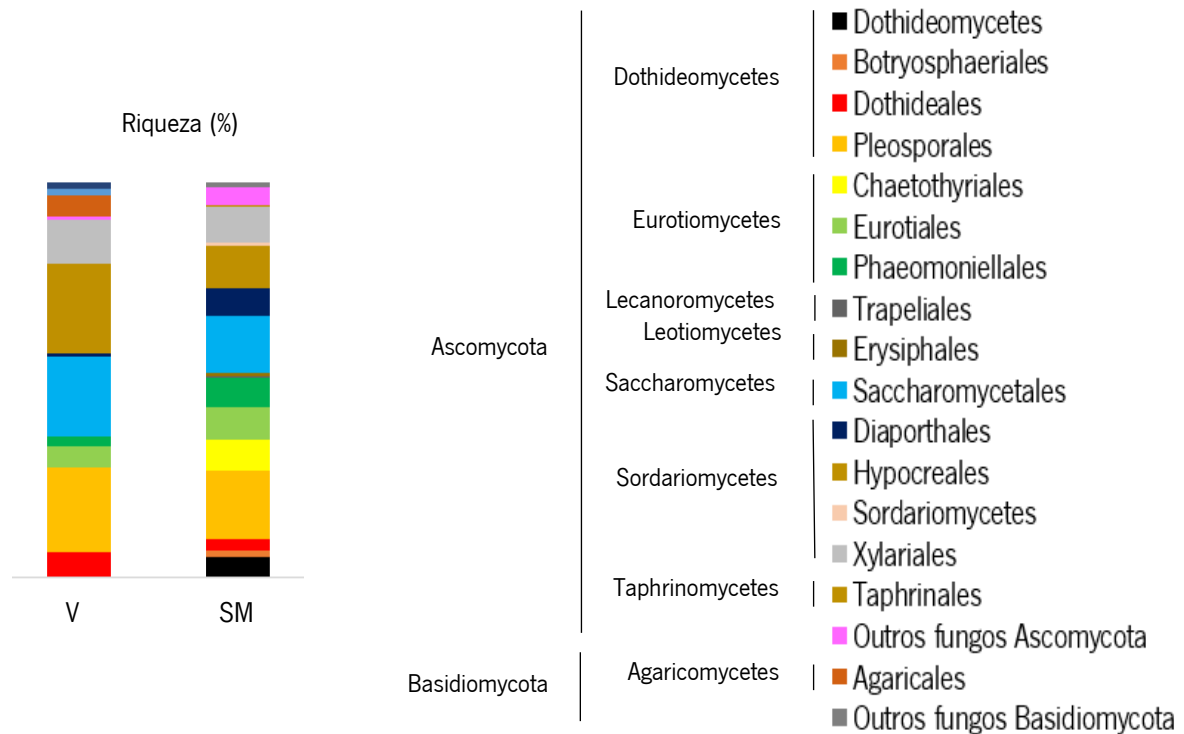
**Figura 28.** Riqueza fúngica exclusiva de azeitonas verdes biológicas (AB) e provenientes de produção integrada (PI). Ordens com riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.

A riqueza da comunidade fúngica endofítica e epifítica das azeitonas de produção integrada aumentou com a maturação do fruto, ao contrário do verificado na comunidade fúngica das azeitonas biológicas, sendo que estas mantiveram uma riqueza elevada independentemente do estado de maturação do fruto (Tabela 9). De modo a compreender as diferenças entre a riqueza fúngica em azeitonas verdes e semi-maduras de produção integrada foi realizado um diagrama de Venn (Figura 27.b), que revelou a existência de 124 ASVs exclusivas da comunidade fúngica nas azeitonas verdes e 436 ASVs exclusivas da comunidade fúngica nas azeitonas semi-maduras provenientes da produção integrada. As ASVs exclusivas das azeitonas verdes e semi-maduras da produção integrada foram classificadas quando à sua ordem fúngica e representadas percentualmente na figura 29.

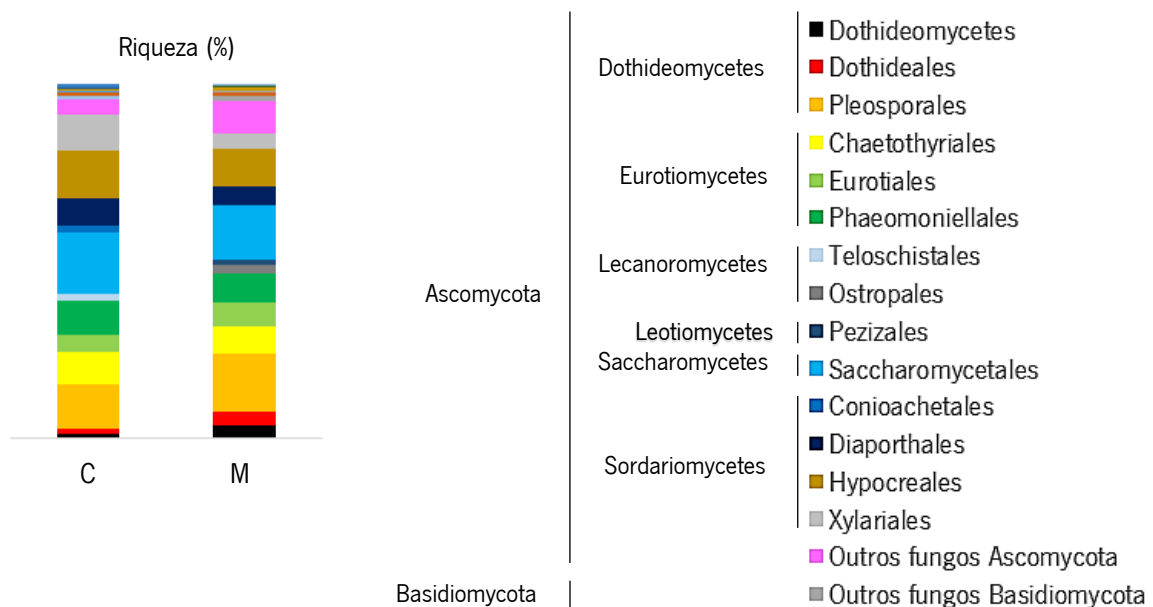
As ASVs exclusivas de cada estado de maturação diferiram entre si principalmente ao nível da ordem Hypocreales (Figura 29). Esta ordem representou 22% da riqueza exclusiva das azeitonas verdes e apenas 10% da riqueza exclusiva das semi-maduras de produção integrada. As espécies da ordem Hypocreales têm sido amplamente utilizadas na erradicação de pragas do solo e plantas (Kaya & Lacey, 2007), pelo que a sua elevada riqueza em azeitonas verdes comparativamente às semi-maduras, pode estar relacionada com a sua menor suscetibilidade à doença da gafa. As ASVs Hypocreales exclusivas das azeitonas verdes de produção integrada consistiram em *Sarocladium strictum* (26%), *Trichothecium roseum* (13%), *Fusarium* spp. (19%), *Gibberella* spp. (13%), Nectriaceae (13%), *Acremonium* spp. (11%) e *Fusarium proliferatum* (6%) (anexo 4). Destes, *Sarocladium strictum*, *Trichothecium roseum* e *Acremonium* spp. já foram descritos como agentes de biocontrolo contra agentes fitopatogénicos (Rojas *et al.* 2020, Jayaprakashvel *et al.* 2010, Sathiyabama & Balasubramanian, 2018). Além disso, nas azeitonas verdes de produção integrada verificou-se uma menor abundância relativa do agente causador da doença da gafa (*Colletotrichum* spp., classe Sordariomycetes), relativamente às azeitonas semi-maduras, observando-se um aumento de cerca de 6 vezes durante a maturação (de 0,2% em azeitonas verdes para 1,2% nas semi-maduras). Efetivamente, as azeitonas semi-maduras de produção integrada apresentam maior suscetibilidade à doença da gafa do que as verdes (Moral *et al.* 2014). A menor suscetibilidade das azeitonas verdes poderá assim dever-se a estes dois fatores, maior riqueza fúngica de membros Hypocreales e menor abundância de *Colletotrichum* spp. comparativamente às azeitonas semi-maduras, os quais poderão estar relacionados.

A comparação da riqueza da comunidade fúngica entre cultivares da oliveira revelou que a cv. Madural apresenta, geralmente, maior riqueza fúngica do que a cv. Cobrançosa (Tabela 9). Assim sendo, foi gerado um diagrama de Venn para compreender as diferenças entre a riqueza fúngica das cvs. Madural e Cobrançosa (Figura 27.c). Existem 434 ASVs exclusivas da comunidade fúngica nas azeitonas

da cv. Madural e 353 ASVs nas azeitonas da cv. Cobrançosa, as quais foram classificadas quanto à sua ordem fúngica e representadas percentualmente na figura 30.

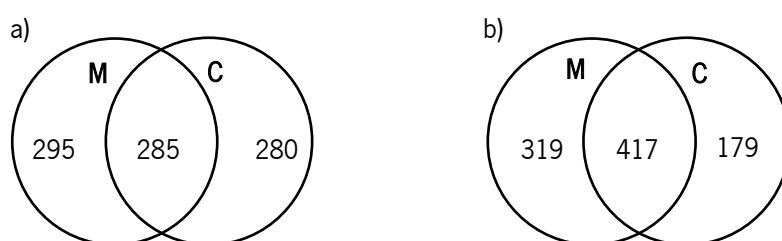


**Figura 29.** Riqueza fúngica exclusiva de azeitonas verdes (V) e semi-maduras (SM) de produção integrada. Ordens com riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.



**Figura 30.** Riqueza fúngica exclusiva de azeitonas Cobrançosa (C) e Madural (M). Ordens com riqueza superior a 1% estão evidenciadas nas cores representadas na legenda.

As ASVs exclusivas de cada cultivar diferiram entre si, principalmente ao nível da ordem Xylariales (Figura 30). Esta ordem foi 2,5 vezes mais rica em azeitonas da cv. Cobrançosa (10%) do que nas da cv. Madural (4%). A ordem Xylariales é uma das mais ricas em espécies produtoras de metabolitos secundários e recentemente vários membros desta ordem têm vindo a demonstrar capacidade de biocontrolo de agentes fitopatogénicos (Becker & Stadler, 2021). Posto isto, a riqueza desta ordem em azeitonas da cv. Cobrançosa pode estar relacionada com a sua menor suscetibilidade à doença da gafa, relativamente a azeitonas da cv. Madural. As ASVs da ordem Xylariales, exclusivas das azeitonas da cv. Cobrançosa, consistiram em membros das famílias Xylariaceae (33%), Sporocadaceae (27%), outras famílias Xylariales (13%), assim como *Pseudophloeospora jollyi* (7%), *Eutypa* spp. (6%), *Phialemoniopsis* spp. (6%), *Daldinia vernicosa* (2%) *Phialemoniopsis cornearis* (2%) *Pestalotiopsis* spp. (2%) e *Annulohyphoxylon* spp. (1%) (anexo 5). Membros de *Phialemoniopsis* spp. e *Annulohyphoxylon* spp. já foram descritos como agentes de biocontrolo de agentes fitopatogénicos (Amninder *et al.* 2014, Gauchan *et al.*, 2020). Em 2015, Landum *et al.*, descreveram membros da ordem Xylariaceae como agentes de biocontrolo de *Colletotrichum acutatum*. Nas azeitonas da cv. Cobrançosa verificou-se uma abundância relativa de *Colletotrichum* spp. de 1,9%, enquanto que as da cv. Madural apresentaram apenas uma abundância de 1,4%, o que corresponde a uma redução de 0,73 vezes. Este resultado está relacionado com a maior tolerância das azeitonas cv. Cobrançosa à doença da gafa, relativamente às da cv. Madural. De salientar que neste estudo apenas foram consideradas azeitonas aparentemente saudáveis, pelo que a cv. Cobrançosa apesar de apresentar uma maior abundância de *Colletotrichum* spp. não apresentava sintomatologia da gafa. A menor suscetibilidade de Cobrançosa à doença da gafa pode assim dever-se à maior riqueza da ordem Xylariales relativamente à cv. Madural, a qual pode condicionar a abundância do agente causal da gafa. Deste modo, na tentativa de relacionar a tolerância da cv. Cobrançosa à gafa com a presença de determinados grupos fúngicos, foram averiguadas as ASVs exclusivas da comunidade epifítica e endofítica desta cultivar (Figura 31).

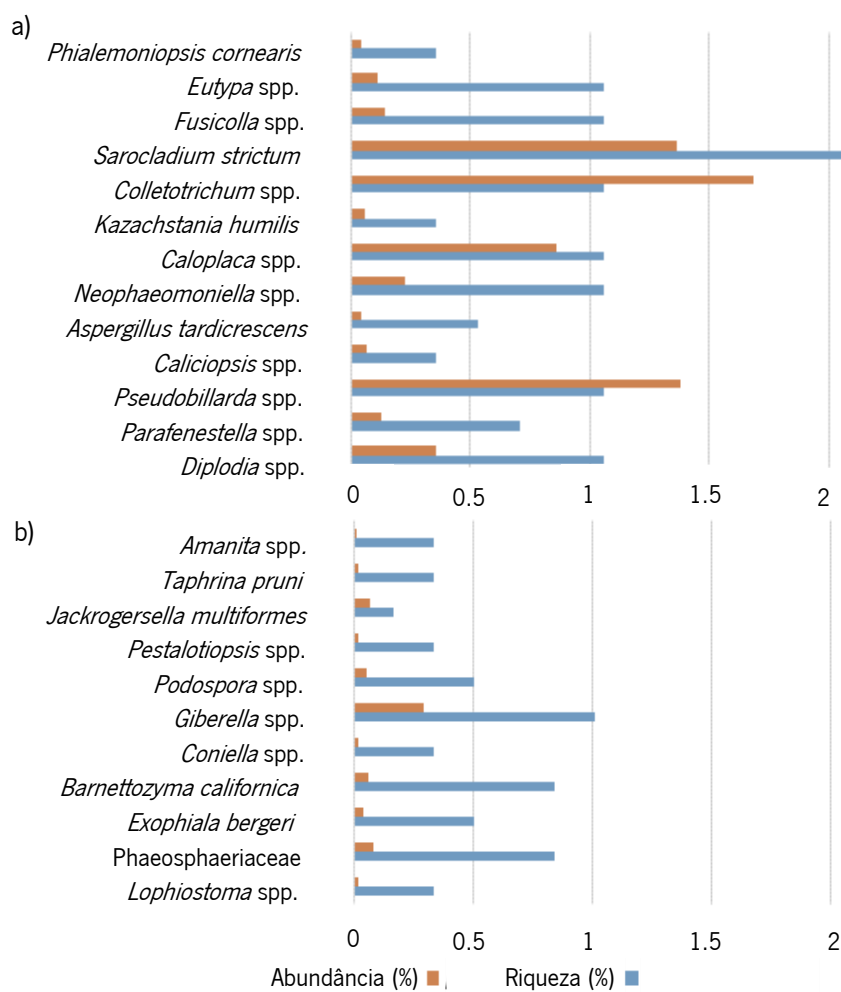


**Figura 31.** Diagrama de Venn com as ASVs exclusivas e partilhadas entre a comunidade fúngica epifítica (a) e endofítica (b) de azeitonas das cvs. Madural (M) e Cobrançosa (C).

As azeitonas das cvs. Madural e Cobrançosa partilharam 57% e 70% das suas comunidades fúngicas endofíticas e apenas 49% e 51% das epifíticas, respetivamente. Assim sendo compatilharam

mais a sua riqueza fúngica endofítica da azeitona do que a epifítica. Os grupos taxonômicos exclusivos da comunidade epifítica e endofítica da cv. Cobrançosa estão representados na Figura 32.

Os grupos taxonômicos epifíticos exclusivos da cv. Cobrançosa apresentaram, no geral, maior riqueza e abundância relativa do que os endofíticos (Figura 32). Os epifitos exclusivos das azeitonas da cv. Cobrançosa, *Sorocladium strictum* (abundância de 1,3%; riqueza de 2,1%), *Caloplaca* spp. (abundância de 0,8%; riqueza de 1%) e *Phialemoniopsis cornearis* (abundância de 0,04%; riqueza de 0,3%), já foram previamente destacados pela sua capacidade antifúngica, inclusivamente contra agentes fitopatogénicos (Rojas *et al.*, 2020, Manojlovic *et al.*, 2005, Mastan *et al.*, 2019). Também *Pseudobillarda* sp. (abundância de 0,8%; riqueza de 1%) já foi descrita como agente de biocontrolo do nemátode parasita de plantas *Rotylenchulus reniformis* (Russi, 2012). No entanto, nenhum relato sobre a relação deste género com as plantas é conhecido. *Fusicolla* spp., *Kazachstania humilis*, *Aspergillus tardicrescens* e *Parafenestella* spp. não foram descritos, até ao momento, como agentes fitopatogénicos



**Figura 32.** Abundâncias relativas e riqueza dos grupos taxonômicos epifíticos (a) e endofíticos (b) presentes exclusivamente em azeitonas das cvs. Cobrançosa e Madural.

nem como potenciais agentes de biocontrole. Os restantes gêneros e espécies epifíticos exclusivos da cv. Cobrançosa foram descritos como sendo fitopatogênicos (Trouillas & Gubler, 2004; Loureiro *et al.* 2018; Kraus *et al.* 2020; Shamoun *et al.* 2003; Hanso & Drenkhan). *Colletotrichum* spp. (abundância de 1,6%; riqueza de 1%) foi um dos gêneros fitopatogênicos encontrados exclusivamente na episfera da cv. Cobrançosa, o que corrobora a maior tolerância desta cultivar à doença da gafa, comparativamente à cv. Madural. Apesar deste gênero estar presente na episfera das azeitonas da cv. Cobrançosa nenhuma destas exibiu sintomatologia da gafa. Nas azeitonas aparentemente sãs da cv. Madural não foram identificadas ASVs de *Colletotrichum* spp. na sua episfera, sugerindo que a sua ausência pode evitar o aparecimento dos sintomas da gafa.

Dos *taxa* endofíticos exclusivos da cv. Cobrançosa, *Barnettozyma californica* (abundância de 0,05%; riqueza de 0,8%) foi previamente reportada por exibir *in vitro* efeitos antagonistas contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Fu *et al.* 2016). Espécies do gênero *Amanita* (abundância de 0,01%; riqueza de 0,3%) apresentam também capacidade inibitória *in vitro* contra agentes fitopatogênicos (Rodrigues & Martins, 2005). *Jackrogersella multifformes*, *Podospora* spp. e *Lophiostoma* spp. não foram descritos, até ao momento, como agentes fitopatogênicos nem como potenciais agentes de biocontrole. Os restantes grupos taxonômicos endofíticos exclusivos da cv. Cobrançosa foram previamente descritos como sendo agentes fitopatogênicos (Yamada *et al.* 1990; Hlaiem *et al.* 2018; Pereyra & Dill-Macky, 2008; Çeliker *et al.* 2012; Vicente *et al.* 2008; Phookamsak *et al.* 2014). Posto isto, na comunidade fúngica epifítica de cv. Cobrançosa detetaram-se mais prováveis agentes de biocontrole de *Colletotrichum* spp. do que na comunidade endofítica. Além disso, os potenciais agentes de antagonismo epifíticos apresentam também maior abundância e riqueza do que os endofíticos. *Soracladium strictum*, *Caloplaca* spp., *Phialemoniopsis cornearis*, *Pseudobillarda* spp., *Barnettozyma californica* e *Amanita* spp., deverão ser considerados para futuros ensaios de antagonismo contra *Colletotrichum* spp. No entanto, *Soracladium strictum* parece o mais promissor uma vez que apresentou uma abundância e riqueza elevada comparativamente aos restantes. Além disso, já se verificara anteriormente neste trabalho uma elevada riqueza desta espécie em azeitonas verdes (menos suscetíveis à doença) comparativamente às semi-maduras (mais suscetíveis à doença) de produção integrada (anexo 4). O estudo da função ecológica de *Fusicolla* spp., *Kazachstania humilis*, *Aspergillus tardicrescens*, *Parafenestella* spp., *Jackrogersella multifformes*, *Podospora* spp. e *Lophiostoma* spp. na oliveira poderá ser pertinente para a seleção de agentes de biocontrole.

O estado de maturação, modo de produção e cultivar para além de afetarem a riqueza da comunidade fúngica endofítica e/ou epifítica afetaram também a estrutura destas comunidades (Tabela 8). Deste modo, foram realizados testes estatísticos (ANOSIM) com base no coeficiente de Bray-Curtis

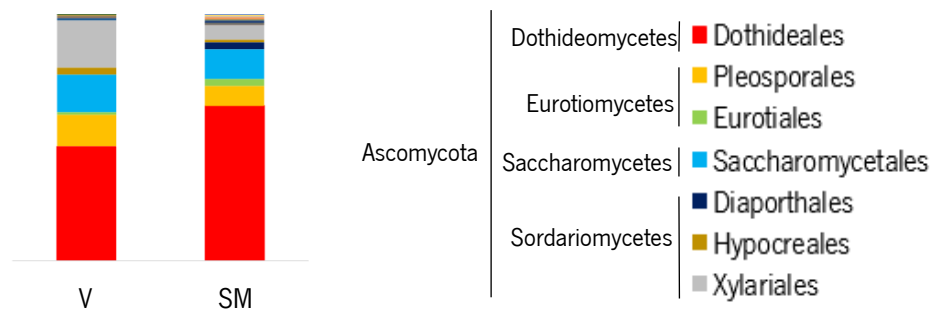
para verificar como a estrutura da comunidade fúngica varia entre grupos que diferem apenas no estado de maturação, modo de produção ou cultivar da azeitona (Tabela 10). Os resultados da tabela 10 permitiram concluir que a estrutura das comunidades fúngicas epifíticas não variou entre azeitonas em diferentes estados de maturação, modos de produção ou cultivares. Isto indica que estes fatores têm pouca influência na estruturação da comunidade fúngica epifítica como já fora constatado anteriormente (Tabela 8). Verificou-se que o estado de maturação é o fator que mais afeta a estruturação da comunidade endofítica, seguido pelo modo de produção e finalmente pela cultivar, estando de acordo com os dados da tabela 8. As azeitonas de produção integrada sofreram alterações significativas na estrutura da sua comunidade fúngica endofítica com a maturação do fruto, independentemente da cultivar. Posto isto,

**Tabela 10.** Resultados do teste estatístico ANOSIM com base no coeficiente de Bray-Curtis entre grupos fúngicos provenientes de azeitonas que variam apenas no estado de maturação (a), modo de produção (b) ou cultivar (c). Os resultados são representados pelo valor de *R* e *p*. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão destacadas a negrito.

a)		Estado de Maturação	
Epifitos	Agricultura Biológica	Madural	$p=0,89$ $R=-0,16$
		Cobrançosa	$p=0,15$ $R=0,10$
	Produção Integrada	Madural	$p=0,12$ $R=0,26$
		Cobrançosa	$p=0,5$ $R=-0,01$
Endófitos	Agricultura Biológica	Madural	<b><math>p=0,01</math> <math>R=0,96</math></b>
		Cobrançosa	$p=0,23$ $R=0,08$
	Produção Integrada	Madural	<b><math>p=0,01</math> <math>R=0,66</math></b>
		Cobrançosa	<b><math>p=0,03</math> <math>R=0,28</math></b>
b)		Modo de Produção	
Epifitos	Verdes	Madural	$p=0,37$ $R=0,07$
		Cobrançosa	$p=0,45$ $R=-0,004$
	Semi-maduras	Madural	$p=0,64$ $R=-0,07$
		Cobrançosa	$p=0,63$ $R=-0,06$
Endófitos	Verdes	Madural	<b><math>p=0,05</math> <math>R=0,14</math></b>
		Cobrançosa	$p=0,22$ $R=0,11$
	Semi-maduras	Madural	$p=0,13$ $R=0,13$
		Cobrançosa	<b><math>p=0,003</math> <math>R=0,49</math></b>
c)		Cultivar	
Epifitos	Verdes	Agricultura biológica	$p=0,51$ $R=-0,03$
		Produção intergada	$p=0,55$ $R=-0,03$
	Semi-maduras	Agricultura biológica	$p=0,90$ $R=-0,11$
		Produção intergada	$p=0,11$ $R=0,18$
Endófitos	Verdes	Agricultura biológica	$p=0,87$ $R=-0,25$
		Produção intergada	$p=0,11$ $R=0,27$
	Semi-maduras	Agricultura biológica	<b><math>p=0,003</math> <math>R=0,45</math></b>
		Produção intergada	$p=0,59$ $R=-0,04$

foi verificado qual o impacto da maturação na comunidade endofítica das azeitonas provenientes de produção integrada (Figura 33). As abundâncias relativas das ordens de cada estado de maturação diferiram entre si, principalmente ao nível da ordem Dothideales (Figura 33). Esta ordem representou uma abundância relativa de 46% nas azeitonas verdes e de 62% nas semi-maduras provenientes de produção integrada. Nas azeitonas semi-maduras, a ordem Dothideales foi constituída por *Aureobasidium* spp. (97%) e membros *Dothideaceae* (3%) (anexo 4). Averiguando a abundância relativa de *Colletotrichum* spp., constatou-se que este género apresentou uma abundância relativa de 0,5% em azeitonas verdes e de 0,2% nas semi-maduras na endosfera, o que contrasta com a sua maior abundância total nas azeitonas semi-maduras do que nas verdes (0,2% em azeitonas verdes e 1,2% nas semi-maduras). O aumento da abundância de *Aureobasidium* spp. na comunidade endofítica nas azeitonas semi-maduras, comparativamente às verdes (Figura 33), pode ser responsável pela diminuição da abundância de *Colletotrichum* spp. na endosfera, uma vez que este género foi descrito como um agente de biocontrolo eficaz contra vários agentes fitopatogénicos (Nigro *et al.* 2018). Isto sugere que a elevada abundância de *Colletotrichum* spp. em azeitonas semi-maduras de produção integrada comparativamente às verdes deve-se, sobretudo, à presença de *Colletotrichum* spp. na episfera.

### 3.4. Conclusão



**Figura 33.** Abundâncias relativas das ordens fúngicas endofíticas associadas a azeitonas verdes (V) e semi-maduras (SM) provenientes de produção integrada. Ordens com abundância relativa e/ou riqueza superior a 1% estão representados na legenda.

O isolamento e caracterização dos fungos da endosfera e episfera da azeitona permitiu distinguir um total de 1.350 ASVs. Estas pertenceram ao filo Basidiomycota e, maioritariamente, ao filo Ascomycota. Neste estudo, detetaram-se na azeitona, pela primeira vez, as classes Saccharomycetes, Lecanoromycetes, Taphrinomycetes, Agaricomycetes, Pezizomycetes e Leotiomycetes, através de uma abordagem *metabarcoding*. *Aureobasidium* foi o género mais abundante no fruto em estudo. A comparação entre a comunidade endofítica e epifítica da azeitona permitiu concluir que estas diferem significativamente quanto à sua composição. Independentemente do estado de maturação, modo de



produção ou cultivar da oliveira, Saccharomycetales é a ordem fúngica mais abundante na episfera e Dothideales na endosfera da azeitona. Dos fatores testados neste trabalho (estado de maturação, modo de produção, e cultivar), o 'modo de produção' foi o que mais afetou a riqueza da comunidade fúngica da azeitona e o 'estado de maturação' a estrutura da comunidade. Em ambos os casos, a comunidade fúngica endofítica da azeitona foi mais afetada do que a comunidade epifítica.

As azeitonas verdes de agricultura biológica apresentaram maior riqueza fúngica do que as azeitonas verdes de produção integrada, sobretudo ao nível da ordem Dothideales. Assim sendo, a maior suscetibilidade das azeitonas biológicas à gafa poderá estar associada à maior riqueza em fungos prejudiciais à fitossanidade, dada a evidente riqueza em fungos da ordem Dothideales, que inclui muitas espécies fitopatogénicas. Nas azeitonas verdes de produção integrada verificou-se uma maior riqueza relativa da ordem Hypocreales (sobretudo da espécie *Soracladium strictum*) comparativamente às semi-maduras. A maior suscetibilidade das semi-maduras parece relacionar-se com o aumento da abundância de *Colletotrichum* spp. na episfera. Na endosfera destas azeitonas, a abundância de *Colletotrichum* spp. diminui com o amadurecimento do fruto, possivelmente devido ao aumento da abundância do género *Aureobasidium*.

Este estudo corrobora a já reportada maior tolerância das azeitonas da cv. Cobrançosa à doença da gafa comparativamente às da cv. Madural (Cordeiro *et al.* 2011). Na episfera das azeitonas da cv. Madural, aparentemente sãs, não foram detetado *Colletotrichum* spp., sugerindo que a sua possível presença poderia eventualmente potenciar o aparecimento de sintomatologia da gafa. Por outro lado, as azeitonas da cv. Cobrançosa, apesar de apresentarem *Colletotrichum* spp. na sua episfera, não desenvolveram sintomatologia da gafa. A maior tolerância das azeitonas da cv. Cobrançosa à presença de *Colletotrichum* spp. poderá relacionar-se com a sua maior riqueza relativa da ordem Xylariales, comparativamente às da cv. Madural.

Os epífitos *Soracladium strictum*, *Caloplaca* spp., *Phialemoniopsis cornearis*, *Pseudobillarda* spp., e os endófitos *Barnettozyma californica* e *Amanita* spp. estão exclusivamente presentes na cultivar mais tolerante e já foram descritos como potenciais agentes de biocontrolo. Posto isto, deverão ser considerados para futuros ensaios de antagonismo contra *Colletotrichum* spp.. Não obstante, *Soracladium strictum* parece ser a espécie mais promissora, uma vez que apresentou uma riqueza e abundância elevada em cv. Cobrançosa, comparativamente aos restantes potenciais agentes de biocontrolo. Além disso, foi verificada a sua elevada riqueza em azeitonas verdes provenientes de produção integrada (pouco suscetíveis à doença da gafa), comparativamente às semi-maduras (mais suscetíveis à doença da gafa).

### 3.5. Referências bibliográficas

- Ahmadi E, Kowsari M, Azadfar D, Jouzani GS. 2018. Protocolos rápidos e econômicos para extração de DNA genômico e metagenômico de carvalho (*Quercus brantii* Lindl.). *Annals of Forest Science* 75:43
- Abdelfattah A, Li Destri Nicosia MG, Cacciola SO, Droby S, Schena L. 2015. Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS One* 10:e0131069
- Ahn JY, Min J, Lee SH, Jang A, Park CK, Kwon SD. 2014. Metagenomic analysis for identifying kimchi sp. during the industrial-scale batch fermentation. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 6:8–15.
- Albanese D, Fontana P, De Filippo C, Cavalieri D, Donati C. 2015. MICCA: a 550 complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Sci. Rep.* 5:9743.
- Amninder K, Rogers KD, Swenson DE, Dowd PF, Wicklow DT, Gloer JB. 2014. Bioactive natural products from fungicolous Hawaiian isolates: secondary metabolites from a *Phialemoniopsis* sp. *Mycology* 3: 120-129.
- Andrews S. 2010. FastQC - A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Anvarian AHP, Cao Y, Srikumar S, Fanning S, Jordan K. 2016. Flow cytometric and 16S sequencing methodologies for monitoring the physiological status of the microbiome in powdered infant formula production. *Frontiers in Microbiology*. 7:968.
- Aronesty E. 2011. ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. Disponível em: <http://code.google.com/p/ea-utils>.
- Becker K, Stadler M. 2021. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. *J Antibiot* 74:1–23.
- Callan BE, Carris LM. 2004. Fungi on living plant substrata, including fruits. *Biodiversity of Fungi* 105-126.
- Cao Y, Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S. 2017. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology* 8:1971-1987.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336.
- Carmona M, Barreto D, Fortugno C. 1996. Occurrence of halo spot in barley caused by *Pseudoseptoriadonacis* in Argentina. *EPPO Bulletin* 26: 431-439.
- Çeliker NM, Uysal A, Çetinel B, Poyraz D. 2012. Crown rot on pomegranate caused by *Coniella granati* in Turkey. *Australasian Plant Dis. Notes* 7:161–162.
- Clarke KR. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18:117–143.

- Costa D, Fernandes T, Martins F, Pereira JA, Tavares RM, Santos PM, Baptista P, Lino-Neto T. 2021. Illuminating *Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research* 245.
- Cordeiro AM, Calado ML, Morais N, Miranda A, Carvalho MT. 2011. Variedades de oliveira: Madural. *Vida Rural*.
- Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- Edgar RC. 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10:996–998.
- Ercolini D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 10:3148-55.
- Fu SF, Sun PF, Lu HY, Wei JY, Xiao HS, Fang WT, Cheng BY, Chou JY. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology* 3:433-448.
- Gauchan DP, Véléz H, Acharya A, Östman JR, Lundén K, Elfstrand M, García-Gil MR. 2020. *Annulohypoxylon* sp. strain MUS1, an Endophyte isolated from *Taxus 2 wallichiana* Zucc. produces Taxol and Other Bioactive Metabolites. *bioRxiv*.
- Ghosh A, Mehta A, Khan AM. 2019. Metagenomic Analysis and its Applications. Em: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. *Elsevier* 184–193.
- Gomes T, Pereira JA, Benhadi J, Lino-Neto T, Baptista P. 2018. Endophytic and Epiphytic Phyllosphere Fungal Communities Are Shaped by Different Environmental Factors in a Mediterranean Ecosystem. *Microbial ecology* 76:668-679.
- Hanso M, Drenkhan R. 2009. *Diplodia pinea* is a new pathogen on Austrian pine (*Pinus nigra*) in Estonia. *Plant Pathology* 58: 797.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:9.
- Henderson PA, Seaby RMH. 2014. Community Analysis Package Version 5, Pisces 652 Conservation Ltd, Lymington, UK.
- Hlaiem S, Zouaoui-Boutiti M, Jemâa MLB., Rocca GD, Barberini S, Danti R. 2018. Identification and pathogenicity of *Pestalotiopsis chamaeropsis*, causal agent of white heather (*Erica arborea*) dieback, and in vitro biocontrol with the antagonist *Trichoderma* sp. *Tunisian Journal of Plant Protection* 13: 49-60.
- Jayaprakashvel M, Selvakumar M, Srinivasan K, Ramesh S, Mathivanan N. 2010. Control of sheath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichothecium roseum* MML003. *European Journal of Plant Pathology* 126:229–239.

- Joshi NA, Fass JN. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33).
- Loureiro A, Talhinhos P, Oliveira H. 2018. A gafa da oliveira é causada por fungos de diversas espécies, com distinta distribuição geográfica, virulência e preferência pela cultivar. *Revista de Ciências Agrárias* 41: 141-50.
- Landum MC, Félix MR, Alho J, Garcia R, Cabrita MJ, Rei F, Varanda CMR. 2016. Atividade antagônica de fungos de *Olea europaea* L. contra *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological Research* 183:100-108.
- Kaya HK, Lacey LA. 2007. Introdução ao controle microbiano. Em: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.
- Knight R, Jansson J, Field D, Fierer N, Desai N, Fuhrman JA, Hugenholtz P, van der Lelie D, Meyer F, Stevens R, Bailey MJ, Gordon JI, Kowalchuk GA, Gilbert JA. 2012. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology* 30:513-520.
- Kowalska Z, Pniewski F, Latała A. 2019. DNA barcoding – A new device in phycologist's toolbox. *Ecology and Hydrobiology*. 1–11.
- Kraus C, Damm U, Bien S, Voegelé RT, Fischer M. 2020. New species of Phaeomoniellales from a German vineyard and their potential threat to grapevine (*Vitis vinifera*) health. *Fungal Syst Evol* 6: 139–155.
- Lindahl BD, Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K., Carlsen T, Kjølner R. 2013. Análise da comunidade de fungos por sequenciamento de alto rendimento de marcadores amplificados - um guia do usuário. *New Phytol* 1: 288–99.
- Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolac S, Milosev M. 2005. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia* 76: 244–246.
- Mastan A, Babu CSV, Hiremath C, Srinivas KVNS, Kumar NA, Kumar KJ. 2020. Treatments with native *Coleus forskohlii* endophytes improve fitness and secondary metabolite production of some medicinal and aromatic plants. *International Microbiology* 23: 345–354.
- Materatski P, Varanda C, Carvalho T, Dias AB, Campos MD, Rei F, do Rosário Félix M. 2019. Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biology* 123:66-76.
- Mina D, Pereira JA, Lino-Neto T, Baptista P. 2020. Epiphytic and endophytic bacteria on olive tree phyllosphere: exploring tissue and cultivar effect. *Microbial ecology* 80:145–157.
- Moral J, Xavier C, Roca LF, Romero J, Moreda W, Trapero A. 2014. La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites* 65:e028.
- Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K., Sjökvist E, Kristiansson E. 2009. A região ITS como um alvo para caracterização de comunidades de fungos usando tecnologias emergentes de sequenciamento. *FEMS Microbiol Lett* 1: 97–101.
- Nilsson RH, Larsson K-H, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glöckner FO, Tedersoo L, Saar I, Kõljalg U, Abarenkov K. 2018. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications.

- Nigro F, Antelmi I, Labarile R , Sion V , Pentimone I. 2016. Biocontrol of olive anthracnose by *Aureobasidium pullulans*. *Biological and integrated control of plant pathogens* 116:92-94.
- Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, Pribelsky A, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, McLean J, Lasken R, Clingenpeel SR, Woyke T, Tesler G, Alekseyev MA. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013. Proceedings. 7821: 158-170.
- Pereyra SA, Dill-Macky R. 2008. Colonization of the Residues of Diverse Plant Species by *Gibberella zeae* and Their Contribution to Fusarium Head Blight Inoculum. *Plant Disease* 92.
- Phookamsak R, Liu JK , McKenzie EHC , Manamgoda DS, Ariyawansa H, Thambugala KM, Dai DQ, Erio Camporesi ,Ekachai Chukeatirote ,Nalin N. Wijayawardene ,Ali H. Bahkali ,Peter E. Mortimer , Xu JC, Hyde KD. 2014. Revision of Phaeosphaeriaceae. *Fungal Diversity* 68: 159–238.
- Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12:1.
- Shamoun SF, Ramsfield TD, Kamp BJ. 2003. Biological control approach for management of dwarf mistletoes. *New Zealand Journal of Forestry Science* 3: 373–384.
- Rojas CE, Jensena B, Jørgensen HJL, Latz MAC, Esteban P, Dinga Y, Collinge DB. 2020. Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against Fusarium head blight in wheat. *Biological Control* 144: 104222.
- Rodrigues PC e Martins A. 2005. In vitro interaction of *Amanita muscaria* and *Phytophthora cinnamomi*: possible biocontrol effect. Presidential meeting 2005 Jubille Campus University of Nottingham UK 19-21 December.
- Russi JDC. 2012. Biocontrol Studies of *Rotylenchulus reniformis* in Cotton Crops in Alabama. Doctoral dissertation in Plant Pathology. Auburn University.
- Sathiyabama M, Balasubramanian R. 2018. Protection of groundnut plants from rust disease by application of glucan isolated from a biocontrol agent *Acremonium obclavatum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 116: 316-319.
- Schlaeppli K, Bulgarelli D. 2015. The Plant Microbiome at Work. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 212–217.
- Trouillas FP, Gubler WD. 2004. Identification and characterization of *Eutypa leptoplaca*, a new pathogen of grapevine in Northern California. *Mycol. Res.* 10: 1195–1204.
- Thomas T, Gilbert J, Meyer F. 2012. Metagenomics—A guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* 2:3
- Vandenkoornhuysen P, Qaiser A, Duhamel M, Le Van Amandine, Dufrense A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206: 1196–1206.
- Van Dyk M, Spies C, Mostert L, Halleen F. 2020. Survey of trunk pathogens in South African olive nurseries. *Plant Disease*.

Vicente VA, Attili-Angelis D, Pie MR, Queiroz-Telles F, Cruz LM, Najafzadeh MJ, Hoog GS, Zhao J, Pizzirani-Kleiner A. 2008. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in mycology* 61: 137-144.

Yamada T, Tsukamoto H, Shiraishi T, Nomura T, Oku H. 1990. Detection of Indoleacetic Acid Biosynthesis in Some Species of *Taphrina* Causing Hyperplastic Diseases in Plants. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 532-540.

#### 4. Conclusão

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar as potencialidades do microbioma nativo da oliveira na luta biológica contra a doença da gafa. Para isso estudaram-se os mecanismos de interação entre fungos nativos da oliveira (*Penicillium* spp.) e os seus agentes causadores da gafa (*Colletotrichum* spp.). Os testes de antagonismo entre *Colletotrichum* spp. e *Penicillium* spp. foram realizados em cultura dupla *in vitro* e comprovaram a capacidade inibitória de *Penicillium* spp. A inibição foi conseguida devido a mecanismos de antibiose. Dos inóculos *Colletotrichum* spp. testados, *C. fiorinae* foi o mais inibido por *Penicillium* spp. e os inóculos com maior capacidade de inibição foram *P. aff. commune* e *P. roseopurpureum*. Estes induziram alterações morfológicas nas hifas de *Colletotrichum* spp. (ramificação ou agregação de hifas), sendo que os danos foram mais evidentes quando ocorriam na presença simultânea de duas espécies *Penicillium*, comparativamente na presença de apenas uma. Será necessária investigação adicional para avaliar o potencial de *Penicillium* spp. como agentes de biocontrolo, pois os metabolitos secundários produzidos *in vitro* podem não ser expressos ou ter menor expressão *in vivo*. Além das abordagens culturais usadas para a seleção de agentes de biocontrolo, foi também considerada uma abordagem não cultural. Através de uma análise por *metabarcoding* utilizando a região ITS como *barcode*, comparou-se a comunidade fúngica (epi- e endofítica) de azeitonas de diferentes proveniências com o objetivo de selecionar potenciais agentes de biocontrolo da doença. As azeitonas provieram de dois sistemas de produção diferentes (agricultura biológica e produção integrada) e de duas cultivares com diferentes suscetibilidades à gafa (cv. *Madural* – moderadamente suscetível – e cv. *Cobrançosa* – resistente). A comunidade fúngica associada a cada cultivar foi também investigada em frutos em diferentes estados de maturação (verdes e semi-maduros).

Este foi o primeiro estudo que caracterizou separadamente a comunidade fúngica endofítica e epifítica da azeitona recorrendo a esta metodologia. Pela primeira vez foram detetados membros das classes Saccharomycetes, Lecanoromycetes, Taphrinomycetes, Agaricomycetes, Pezizomycetes e Leotiomycetes na azeitona através desta abordagem. Fungos que, previamente foram descritos como abundantes na azeitona, foram igualmente detetados neste trabalho, como é o caso do género *Aureobasidium*. As comunidades fúngicas epi- e endofíticas apresentaram diferenças, a nível da riqueza e estrutura entre estados de maturação, modos de produção e cultivares. Independentemente destes fatores, Saccharomycetales foi a ordem fúngica mais abundante na episfera e Dothideales na endosfera da azeitona. O fator 'modo de produção' foi o que mais afetou a riqueza da comunidade fúngica da azeitona e o fator 'estado de maturação' a estrutura da comunidade. Em ambos os casos, a comunidade fúngica endofítica da azeitona foi mais afetada do que a comunidade epifítica. Além disso, a comunidade fúngica epifítica revelou-se mais divergente em comparação com a comunidade endofítica. Esse resultado

pode estar relacionado à endosfera ser mais propensa a reter comunidades microbianas do que a episfera, cujas comunidades de fungos estão mais expostas às condições ambientais. Além disso, deve ser tida em consideração a variação química que ocorre na endosfera da azeitona, no decorrer da maturação da azeitona e de acordo com a cultivar em consideração.

Os resultados deste trabalho indicam que a suscetibilidade das azeitonas à doença da gafa poderá, em parte, estar relacionada com a presença e abundância de determinados *taxa* fúngicos. A riqueza da ordem Dothideales poderá estar relacionada com a suscetibilidade da azeitona e a riqueza das ordens Hypocreales e Xylariales poderá relacionar-se com a sua tolerância. O modo de produção integrada resultou numa redução para metade do inóculo *Colletotrichum* spp., comparativamente à produção biológica. Contudo, a maturação das azeitonas de produção integrada resultou no aumento da abundância relativa de *Colletotrichum* spp., que ocorreu principalmente ao nível da episfera. Na endosfera a abundância do agente causador da gafa diminuiu com o amadurecimento do fruto, possivelmente devido ao aumento em abundância do género *Aureobasidium* spp.. Este estudo corroborou ainda a maior tolerância das azeitonas da cv. Cobrançosa relativamente às da cv. Madural. Isto porque as azeitonas da cv. Madural, aparentemente sãs, não apresentaram *Colletotrichum* spp. na sua episfera. A possível presença de espécies deste género poderia eventualmente conduzir ao aparecimento de sintomatologia da gafa. Pelo contrário, as azeitonas da cv. Cobrançosa apresentaram *Colletotrichum* spp. na sua episfera, mas não desenvolveram sintomatologia da gafa.

As cultivares em estudo exibiram quantidades diferentes de fungos com funções ecológicas distintas, o que poderá explicar, pelo menos em parte, as suas diferentes suscetibilidades à doença da gafa. Considerando que a cv. Cobrançosa é tolerante e a cv. Madural suscetível à gafa, foram selecionados os candidatos mais promissores para o controlo biológico do agente causal da gafa. Verificou-se que a comunidade fungica exclusiva das azeitonas da cv. Cobrançosa contém microrganismos benéficos como: *Soracladium strictum*, *Caloplaca* spp., *Phialemoniopsis cornearis*, *Pseudobillarda* spp., *Barnettozyma californica* e *Amanita* spp. que poderão ajudar no combate à doença. Estes microrganismos deverão ser explorados como antagonistas de *Colletotrichum* spp., de modo, a que, futuramente, possam constituir agentes de biocontrolo com um impacto positivo significativo na produção de azeitona/azeite. O género *Penicillium*, que exibiu neste trabalho atividade antagonista *in vitro* contra *Colletotrichum* spp., foi detetado nas azeitonas pelo que seu estudo *in vivo* será pertinente.

Este trabalho contribuiu para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade fúngica da azeitona e permitiu selecionar espécies com potencial bioprotetor da oliveira. Globalmente, os resultados permitiram revelar relações microrganismo-microrganismo e microrganismo-hospedeiro demonstrando a importância de integrar as abordagens culturais e não culturais no estudo do microbiota vegetal. Os



resultados deste trabalho demonstram ainda a importância dos estudos *in vivo*, uma vez que as interações entre microrganismos pode ser alterada pela presença de outros.

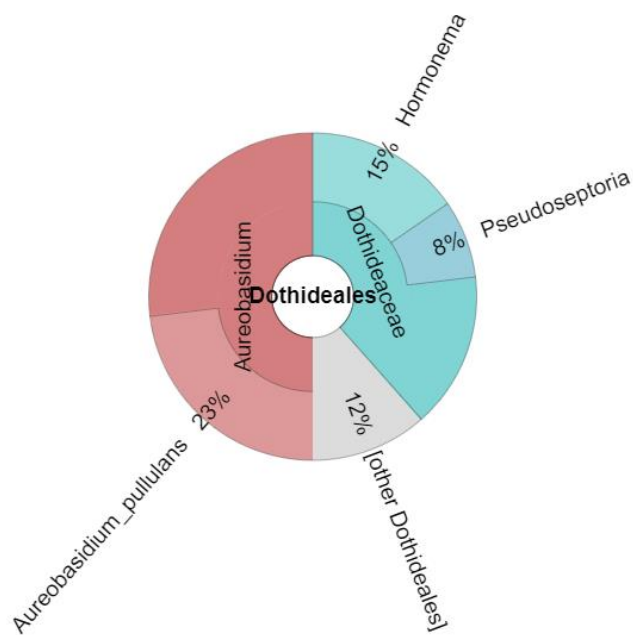
## 5. Anexos

### Anexo 1. Extração de DNA dos epífitos da azeitona:

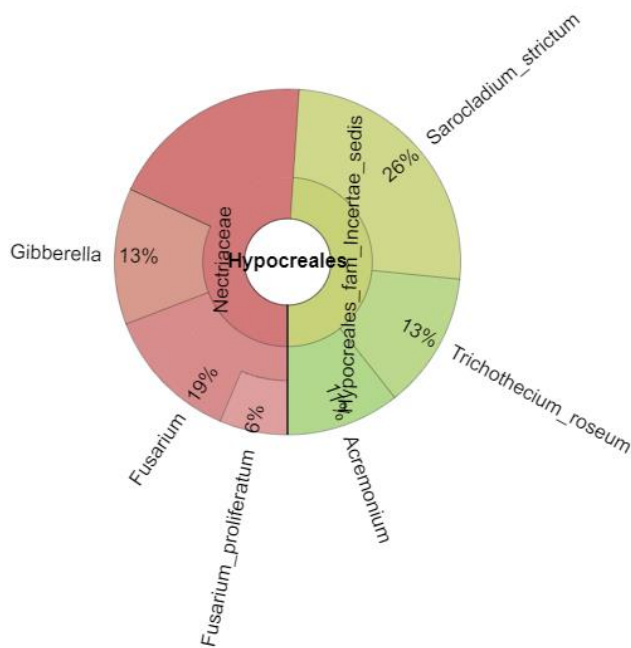
1. Adicionar ao *pellet* proveniente do isolamento dos fungos epífitos 1000  $\mu$ L de PBS buffer (1X, pH 6.7);
2. Agitar durante 3 min a 160 rpm;
3. Centrifugar a 400 *g* por 5 min;
4. Recolher o sobrenadante num novo tubo e centrifugar a 8000 *g* durante 15 min;
5. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 500  $\mu$ L de buffer de suspensão (10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA; 20 mg/mL lisozima; 30  $\mu$ L de 20 mg/mL Proteinase K);
6. Vortexar e misturar por inversão;
7. Incubar a 37°C durante 30 min;
8. Adicionar 500  $\mu$ L de buffer de lise (100mM Tris-HCL pH8.0; 50 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 4% SDS; 2%PVP);
9. Incubar a 60°C por 30 min misturando por inversão a cada 5 min;
10. Adicionar 250  $\mu$ L de acetato de potássio (5M);
11. Adicionar 250  $\mu$ L de fenol:clorofórmio 25:24 e misturar por inversão;
12. Centrifugar a 3000 *g* durante 8 min;
13. Recolher fase aquosa;
14. Adicionar 60  $\mu$ L de acetato de sódio (3M) e 1000  $\mu$ L de etanol absoluto (-20°C);
15. Incubar 3 min à temperatura ambiente;
16. Centrifugar a 14000 *g* durante 10 min;
17. Descartar sobrenadante e secar ao ar;
18. Eluir o DNA em 40  $\mu$ L de água ultra-pura.

### Anexo 2. Extração de DNA dos endófitos da azeitona:

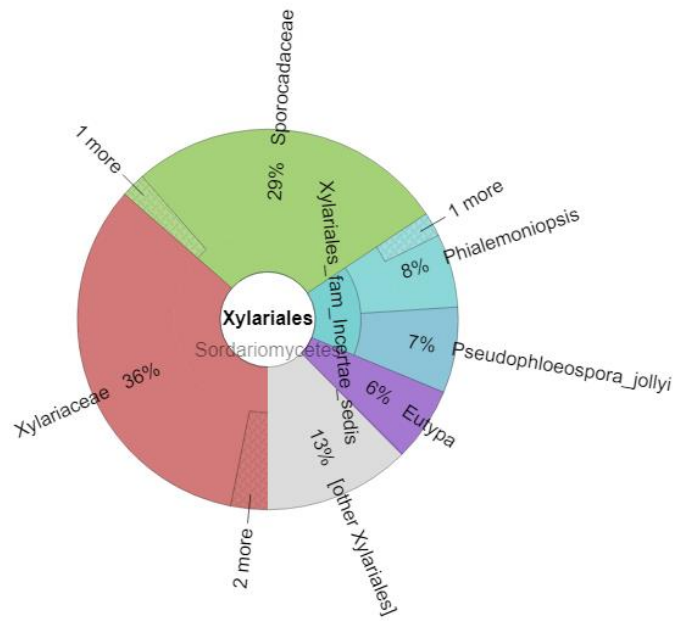
1. Adicionar a 20 *g* de azeitona 800  $\mu$ L de CTAB buffer (2% CTAB, 1% PVP, 100 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20% SDS, 1.4 M NaCl) pré-aquecido a 65°C;
2. Incubar durante 30 minutos a 65°C com agitação (300 rpm) de 5-5 min;
3. Arrefecer em gelo;
4. Adicionar 800  $\mu$ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1);
5. Retirar 600  $\mu$ L e adicionar 500  $\mu$ L de clorofórmio;
6. Centrifugar a 3000 *g* durante 8 min;
7. Recolher 500  $\mu$ L e precipitar o DNA com 2/3 de isopropanol (-20°C) e 1/10 de acetato de sódio por 30 min a -20°C;
8. Centrifugar a 10000 *g* durante 10 min a 4°C;
9. Adicionar 1500  $\mu$ L de etanol a 70% (-20°C);
10. Centrifugar 10 min a 10000 *g* (4°C);
11. Descartar o sobrenadante e secar o pellet ao ar;
12. Eluir o DNA em 40  $\mu$ L de água ultra-pura.



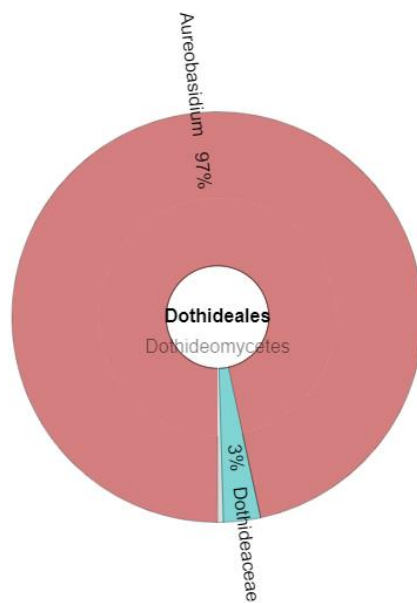
**Anexo 3.** Gráfico kroma da riqueza das ASVs Dothideales isoladas exclusivamente de azeitonas verdes biológicas.



**Anexo 4.** Gráfico kroma da riqueza das ASVs Hypocreales isoladas exclusivamente de azeitonas verdes de produção integrada.



**Anexo 5.** Gráfico kroma da riqueza das ASVs Xylariales isoladas exclusivamente de azeitonas da cv. Cobrançosa.



**Anexo 6.** Gráfico kroma da abundância da ordem Dothideales em azeitonas semi-maduras de produção integrada.