



**Caracterização de potenciais doenças da oliveira e exploração de métodos
de luta biológica contra a tuberculose**

Gilcimar Jesus das Candeias

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia*

Orientado por:

Paula Cristina dos Santos Baptista

Ana Cristina Fermino Soares

Bragança

2019

Dedico ao meu núcleo familiar:

Joaquim, Doralice e Gilcilene

Aos membros das famílias:

Carvalho Moreno; e

Pereira dos Santos

Muitíssimo obrigado a todos

Agradecimentos

Foi um caminho longo para poder realizar esse sonho e gostaria de demonstrar meus sinceros agradecimentos a todos os participantes dessa conquista.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista da Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e a Professora Doutora Ana Cristina Fermino Soares do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela orientação científica, pelo voto de confiança e por terem acreditado na minha capacidade para chegar até aqui, pela dedicação e todos os comentários que me ajudaram a concluir mais essa etapa.

Ao Professor Doutor Celso Luiz Borges de Oliveira do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por ser um profissional excelente e um cidadão humanizado que tive o prazer de trabalhar e conviver nesse período da graduação. À Professora Doutora Soraia Barreto Aguiar Fonteles do CCAAB/UFRB pela atenção e por participar na conquista deste sonho.

Aos corpos docente, discente, técnico e terceirizados da UFRB e do IPB por tornarem esses ambientes excelentes e formadores de cidadãos conscientes.

A todos envolvidos no programa de dupla titulação entre a UFRB e o IPB por possibilitar essa experiência imensurável. Em especial a Professora Doutora Maria da Conceição de Menezes Soglia do CCAAB/UFRB pelo voto de confiança.

A Tânia Isabel da Costa e Silva pelo apoio emocional, infinita paciência e por ser uma pessoa maravilhosa e sempre assertiva.

Por último, mas não menos importante, a todos os colegas e amigos que fiz ao longo da estadia em Cruz das Almas, todos os amigos de Ituberá, Valença e todas as pessoas próximas do Rio Vermelho em Salvador.

Muito obrigado por contribuírem para a realização desse sonho.

Este trabalho foi financiado por fundos do FEDER, COMPETE (Programa Operacional Fatores de Competitividade) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e Tecnologia - FCT – no âmbito do projeto PTDC/AGR-PRO/0856/2014 “XF-FREEOLIVE: Multifunctional study of xylem-sap of Portuguese olive cultivars and its relation with susceptibility to infection by *Xylella fastidiosa*”, e por fundos europeus no âmbito do projeto H2020-SFS-2016-3 “XF-ACTORS - *Xylella fastidiosa* active containment through a multidisciplinary-oriented research strategy”.



Índice

Resumo	VII
Abstract.....	IX
Enquadramento e Objetivos.....	XI
Capítulo 1: Introdução	1
1.1. A cultura da oliveira em Portugal	1
1.2. Principais constrangimentos à produção: o caso da Tuberculose	2
1.3. Microbiota endofítica e luta biológica	5
2. Material e Métodos	7
2.1. Objetivo 1- Caracterizar a população fúngica associada a ramos, folhas e azeitonas que apresentem lesões pouco conhecidas e descritas na oliveira	7
2.1.1. Colheita do material vegetal com lesões	7
2.1.2. Isolamento de fungos a partir do material com lesões	8
2.1.3. Identificação molecular dos isolados fúngicos	8
2.1.4. Análise dos resultados.....	10
2.2. Objetivo 2- Explorar a potencialidade do uso de um consórcio de microrganismos endófitos de oliveira centenária na luta biológica contra a tuberculose da oliveira	10
2.2.1. Isolamento de microbiota endofítica de oliveira centenária	10
2.2.2. Inoculação de plântulas de oliveira	12
2.2.3. Parâmetros avaliados.....	14
3. Resultados e Discussão.....	17
3.1. Objetivo 1- Caracterizar a população fúngica associada a ramos, folhas e azeitonas que apresentem lesões pouco conhecidas e descritas na oliveira	17
3.1.1. Descrição morfológica das lesões	17

3.1.2. Isolamento e identificação dos isolados fúngicos associados às lesões.....	19
3.1.3. Comunidade fúngica associada a cada tipo de lesão.....	21
3.2. Objetivo 2 - Explorar a potencialidade do uso de um consórcio de microrganismos endófitos de oliveira centenária na luta biológica contra a tuberculose da oliveira	25
3.2.1. Incidência	25
3.2.2. Severidade	27
4. Conclusões.....	29
4.1 Conclusões do primeiro objetivo	29
4.2 Conclusões do segundo objetivo.....	29
Referências bibliográficas	30

Resumo

A oliveira é uma cultura muito importante para a região do Mediterrâneo e Península Ibérica. Todavia, na última década, tem-se observado um aumento de incidência de potenciais novas doenças e de doenças comuns desta cultura, tais como a Tuberculose, que causam elevadas perdas ao nível da produção. O presente estudo pretende ser um primeiro contributo para: i) o conhecimento de potenciais novas doenças da oliveira e dos seus agentes causais; ii) a identificação de um novo meio de luta biológico contra a tuberculose da oliveira. Assim, de forma a atingir o primeiro objetivo, começou-se por descrever novas lesões que ocorrem com elevada incidência em ramos, folhas e frutos de oliveiras na região de Mirandela, e por caracterizar a comunidade fúngica que lhe está associada com o intuito de identificar potenciais agentes causais destas lesões. Para atingir o segundo objetivo, avaliou-se o efeito da aplicação de um consórcio de microrganismos endófitos, obtido de oliveiras centenárias com tolerância à tuberculose, na incidência e severidade da tuberculose em plântulas de oliveira. Os resultados obtidos permitiram identificar um total de sete lesões diferentes, a maioria das quais em folhas, podendo cada uma delas corresponder a uma potencial nova doença. Em três destas lesões foi identificada a presença exclusiva de espécies fúngicas (*Neofabraea vagabunda*, *Botrytis* sp., *Phoma macrostoma* e *Cytospora pruinosa*), sugerindo tratarem-se de potenciais agentes causais destas lesões. Este resultado necessita, contudo, de confirmação. A aplicação do consórcio de microrganismos endófitos em plântulas de oliveira permitiu reduzir significativamente a incidência e a severidade da tuberculose face às plantas inoculadas exclusivamente com o agente causal desta doença, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Este efeito benéfico da microbiota na oliveira revelou ser superior quando a inoculação com a microbiota ocorria previamente à inoculação com o patogénico. A utilização desta microbiota endófito poderá constituir uma estratégia inovadora na luta biológica contra a tuberculose, e cujo mecanismo de ação deverá ser estudado no futuro.

Palavras-chave: luta biológica; comunidade microbiana; oliveira; novas doenças.

Abstract

The olive tree is an important crop for the Mediterranean countries, including the Iberian Peninsula. However, in the last decade, there has been an increase in the incidence of potential new diseases and common diseases of this crop, such as olive knot, which cause high yield losses. This study intends to be a first contribution to: i) the knowledge of potential new diseases of the olive tree and its causal agents; (ii) the identification of a new biological control method against olive knot disease. Thus, in order to reach the first objective, we began to describe new lesions that occur with high incidence in branches, leaves and fruits of olive trees in the region of Mirandela, and to characterized the fungal community associated with it in order to identify potential causal agents of these lesions. In order to reach the second objective, the effect of the application of a consortium of endophytic microorganisms, obtained from centennial olive trees with tolerance to olive knot, on the incidence and severity of olive knot in olive tree seedlings was evaluated. Overall, a total of seven different lesions, most of them in leaves, were identified. Each of these lesions could correspond to a potential new disease. Some fungal species (*Neofabraea vagabunda*, *Botrytis* sp., *Phoma macrostoma* and *Cytospora pruinosa*) were found to be unique to a specific lesion, suggesting that they are potential causal agents of these lesions. This result requires, however, confirmation. The application of the consortium of endophytic microorganisms in olive tree seedlings reduced significantly both the incidence and severity of olive knot, when compared to plants inoculated exclusively with the causal agent of this disease, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. This beneficial effect of the microbiota on the olive tree was shown to be highest when inoculation with the microbiota occurred prior to inoculation with the pathogen. The use of this endophyte microbiota could be an innovative strategy in the biological fight against tuberculosis, and its mechanism of action should be studied in the future.

keywords: biological control; microbial community; olive tree; new diseases.

Enquadramento e Objetivos

O olival é uma cultura que, a nível nacional, apresenta uma grande importância económica, social e paisagística. Esta cultura é afetada por várias doenças, incluindo a Tuberculose, que provoca elevados prejuízos ao nível da produção. Para além desta doença, na região de Trás-os-Montes, tem-se vindo a registar nos últimos anos um aumento do aparecimento de lesões em vários órgãos da oliveira. Estas lesões, muito pouco conhecidas e descritas na literatura, poderão corresponder a potenciais doenças da oliveira para as quais se desconhece o seu agente causal.

A exploração biotecnológica de microrganismos que colonizam naturalmente a oliveira poderá ser uma estratégia interessante para a obtenção de produtos que possam ser utilizados na luta biológica contra doenças que atacam esta fruteira. Em particular, existe um enorme interesse na exploração de microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas, vulgarmente designados por endófitos. São vários os estudos que reportam a capacidade de alguns endófitos em reduzirem a incidência e severidade de doenças que atacam espécies fruteiras (Deshmukh, 2018; Miao et al., 2019; Miera et al., 2019), incluindo a oliveira (Preto et al., 2017). Contudo, este efeito tem sido avaliado, na maioria dos estudos, para apenas uma espécie endófito. Tanto quanto se sabe, não existem trabalhos que avaliem o potencial de consórcios de microrganismos endofíticos na luta biológica de doenças. A utilização destes consórcios poderá apresentar vantagens no aumento da eficiência deste meio de luta. De fato, é sabido que os microrganismos não atuam isoladamente (Rovenich et al., 2014). A sua ação pode depender do efeito da interação que estabelecem com outros microrganismos na planta hospedeira, incluindo interações positivas (*e.g.*, cooperação) e negativas (*e.g.*, competição) (Jakuschkin et al., 2016). O efeito do uso de consórcios de microrganismos no tratamento de doenças tem sido mais testado no Homem. São vários os exemplos reportados na literatura que indicam a elevada eficácia do transplante de microbiota fecal de um dador saudável para um doente no tratamento de infeções bacterianas intestinais (Kelly et al., 2015; Wang et al., 2018). À semelhança dos Humanos, o transplante da comunidade microbiana endofítica de uma planta sã para uma planta doente apresenta um enorme potencial na luta contra doenças, mas que permanece ainda inexplorado.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principais objetivos:

1- Caracterizar a população fúngica associada a ramos, folhas e azeitonas que apresentem lesões pouco conhecidas e descritas na oliveira, quer por processos morfológicos como moleculares. Este estudo pretende ser um primeiro contributo para o conhecimento de potenciais novas doenças da oliveira e dos seus agentes causais.

2- Explorar a potencialidade do uso de um consórcio de microrganismos endófitos de oliveira centenária na luta biológica contra a tuberculose da oliveira. A oliveira centenária dadora da microbiota caracteriza-se por apresentar tolerância à tuberculose. Supõe-se que esta tolerância possa ser, em parte, devida à sua composição microbiana endofítica. Espera-se que este estudo seja um contributo para a identificação de um novo meio de luta biológico contra a tuberculose da oliveira.

O presente trabalho encontra-se organizado em quatro partes. Na primeira parte (Introdução) abordam-se aspetos relacionados com a importância da oliveira, em particular para Portugal, e dos principais constrangimentos à produção, dando-se especial ênfase à tuberculose. Por fim, focam-se aspetos no âmbito da microbiota endofítica e suas implicações na área da proteção de plantas. Na segunda parte (Material e Métodos) descrevem-se as metodologias utilizadas na execução deste estudo e os métodos estatísticos aplicados. Na terceira parte (Resultados e Discussão) apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos e finalmente, na última parte (Conclusão), apresentam-se as principais conclusões do trabalho.

Capítulo 1: Introdução

1.1. A cultura da oliveira em Portugal

Olea europaea L. é o nome científico da oliveira, uma das espécies frutícolas cultivadas mais importantes na região do Mediterrâneo. Pertence à família Oleaceae e é uma árvore que produz a azeitona de onde se extrai o azeite muito apreciado no mundo, principalmente pelos seus benefícios para a saúde (Guo et al., 2018).

O cultivo da oliveira é muito antigo. Acredita-se que esta espécie seja originária da Ásia Menor e que seja endêmica da região do Mediterrâneo (COI, 2018). Foi trazida para a Península Ibérica no período do Império Romano pelos Berberes (COI, 2018). Na atualidade, a cultura da oliveira encontra-se já dispersa um pouco por todo o mundo, em localizações com características edafoclimáticas semelhantes às da região do Mediterrâneo (Fig. 1.1; FAOSTAT, 2019).

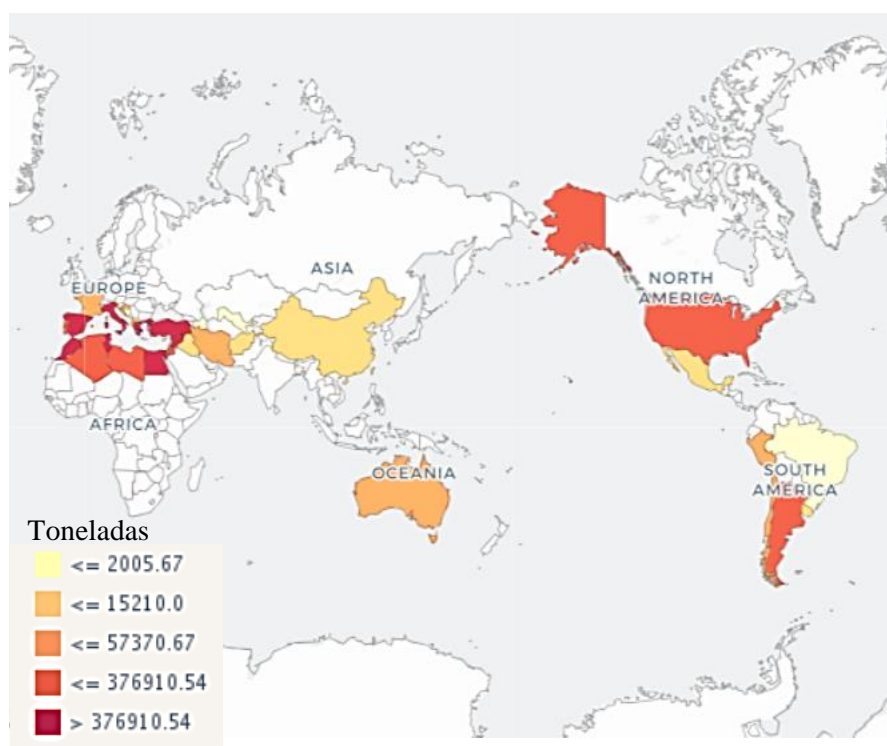


Figura 1.1. Produção média de azeitona (toneladas), de 1994 a 2017, por país (Fonte: FAOSTAT, 2019).

No que concerne em particular a Portugal, os produtos derivados do olival, têm um enorme peso na economia nacional. Portugal ocupa a nona posição no ranking mundial e a quarta posição a nível da UE com uma produção de azeitona na ordem das 377 000 toneladas (valores médios entre 1994 e 2017) (FAOSTAT, 2019). Na campanha de 2016/2017, Portugal exportou mais de 52 000 toneladas de azeitona de mesa e de azeite (COI, 2018). A maioria da área olivícola nacional está localizada nas regiões do interior, sobretudo Alentejo e Trás-os-Montes. Estas duas regiões são responsáveis por 80% da produção de azeitonas e 83% da produção do azeite nacional (Estatísticas Agrícolas, 2017). A cultura da oliveira nestas regiões tem, por isso, grande importância económica, mas também ambiental e social. Para além desta cultura contribuir para a caracterização da paisagem destas regiões, é também uma fonte de rendimento direta e indireta através do turismo, contribuindo assim para evitar o êxodo rural. A existência nestas regiões de produtos do olival com Denominação de Origem Protegida, representam igualmente um valor acrescido para a economia e desempenham um papel preponderante no desenvolvimento das populações locais (Pereira, 2014).

1.2. Principais constrangimentos à produção: o caso da Tuberculose

A cultura da oliveira é alvo de ataque de um grande número de pragas e doenças, provocando estragos e prejuízos avultados ao nível da produção. De uma forma generalizada, considera-se como principais pragas a traça-da-oliveira, *Prays oleae* (Bern.), a mosca-da-zeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi) e a cochonilha-negra, *Saissetia oleae* (Olivier) que, em muitos anos, causam prejuízos que ultrapassam o valor da produção (Pereira & Bento, 2011). No que concerne a doenças, o Olho de Pavão, *Venturia oleaginea* (Castagne) Rossman & Crous, a Gafa, *Colletotrichum* spp., e a Tuberculose, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, são responsáveis pelas maiores perdas de produção nos principais países produtores de azeite e azeitona (Naveiro et al., 2017). Nos olivais da região de Trás-os-Montes e Alto Douro têm surgido, nos últimos cinco anos, novos problemas fitossanitários que começam a ser responsáveis por algumas perdas de produção. Tratam-se de lesões muito pouco conhecidas e descritas na literatura, e que poderão corresponder a potenciais doenças da oliveira para as quais se desconhece o seu agente causal, bem como a sua sintomatologia e epidemiologia.

A Tuberculose da oliveira, é uma patologia causada pela bactéria Gram negativa *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) (Fig. 1.2). A infecção ocorre através de feridas,

em especial no tronco e ramos, formando tumores e galhas. Ocasionalmente a bactéria também pode infetar folhas e frutos (Quesada et al., 2010). A bactéria Pss normalmente está presente na parte aérea da oliveira, podendo colonizar a superfície (colonização epifítica) e o interior (colonização endofítica) dos tecidos vegetais (Quesada et al., 2012). Pensa-se que a infecção possa ser causada pelas bactérias epifíticas, que demonstraram capacidade em sobreviver por muitos anos na parte aérea da oliveira (Quesada *et al.*, 2010) A Pss está normalmente associada a outras espécies bacterianas, pertencentes sobretudo ao género *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Erwinia* e *Curtobacterium* (Buonauro *et al.*, 2015) Estas bactérias demonstraram ter um papel importante na incidência e severidade da doença ao induzirem um aumento da população Pss e promoverem o desenvolvimento de sintomatologia (Buonauro et al., 2015).

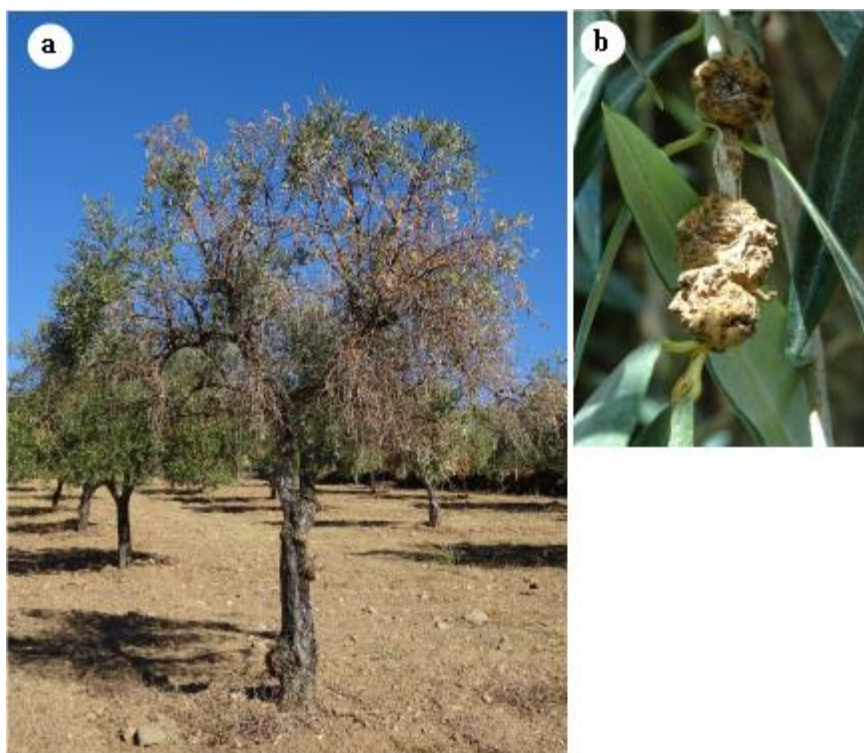


Figura 1.2. Tuberculose da oliveira. A sintomatologia caracteriza-se pela seca e quebra dos ramos (a), devido à formação de tumores que surgem nos rebentos e ramos jovens (b). Fotos: Paula Baptista (ESAB).

A tuberculose é responsável pela diminuição do vigor da árvore, atrofiamento dos ramos, desfoliação e conseqüentemente perda da área fotossintética, podendo em casos graves culminar na morte da árvore (DGAV, 2017). Os frutos de árvores com sintomas de tuberculose podem originar azeites de má qualidade, com sabor a ranço e salgado, e odor desagradável (Lopes & Pinto, 2010). A evolução desta doença pode, assim, originar prejuízos tanto ao nível da produção como na comercialização dos produtos do olival (DGAV, 2017).

Os métodos de luta contra a tuberculose são sobretudo preventivos, uma vez que é bastante difícil erradicar a bactéria quando esta já se encontra presente no olival (Quesada et al., 2010). Neste âmbito é recomendado o uso de algumas técnicas para prevenir a doença, entre elas: 1) plantações com cultivares resistentes; 2) o corte de ramos doentes durante a prática da poda, tendo o cuidado de desinfetar as feridas e os utensílios de corte; 3) evitar a realização de práticas culturais que causem lesões na árvore em épocas do ano com humidade relativa elevada, por favorecer a infeção; 4) realização de fertilizações e rega de um modo racional, de forma a evitar as feridas ocasionadas pela desfoliação; 5) a luta química com recurso a fungicidas à base de cobre tem também sido efetuada para prevenir infeções (Trapero-Casas et al., 2009). Contudo, a eficiência deste tipo de produtos é normalmente baixa e a relação custo-benefício é desfavorável para o olivicultor (Quesada et al., 2010).

A inexistência de métodos de luta eficazes contra a tuberculose associado ao crescimento da agricultura biológica, tem incentivado a realização de estudos com o objetivo de identificar agentes de luta biológica que possam ser usados contra esta doença (Quesada et al., 2012 e 2010; DGAV, 2017). Tanto quanto é do nosso conhecimento, as espécies microbianas com capacidade em inibir Pss foram identificadas apenas com base em ensaios *in vitro*. Por exemplo, *Pseudomonas* sp. isolada da rizosfera da oliveira (Rokni-Zadeh et al., 2008), *P. fluorescens* e *Bacillus subtilis* isolados de tumores e de folhas de oliveira (Krid et al., 2010), mostraram ter a capacidade em inibir o crescimento de Pss em condições *in vitro*. Recentemente, em ensaios efetuados em plântulas de oliveira em condições *in vitro*, foi verificado a capacidade de *P. fluorescens* em reduzir a população de Pss e o número de tumores não tendo, contudo, sido capaz de suprimir o desenvolvimento da doença (Ramos et al., 2013).

1.3. Microbiota endofítica e luta biológica

Os microrganismos endofíticos caracterizam-se por colonizarem inter- e intracelularmente os tecidos internos das plantas, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causarem sintomas aparentes de doença no hospedeiro (Hyde & Soyong, 2008). Neste tipo de associação o microrganismo recebe nutrientes e proteção da planta hospedeira. Por sua vez, o microrganismo confere à planta hospedeira resistência/tolerância a stresses bióticos (patogénicos, herbívoros, pragas, entre outros) e abióticos (secura, salinidade, metais pesados, entre outros) (Soliman et al., 2013). Devido a estas propriedades, a estes microrganismos endófitos tem sido atribuído grande importância na área da proteção das plantas. A sua aplicação na luta biológica contra doenças que afetam espécies agrícolas e florestais de grande importância económica foram já descritas (revisado por Dutta et al., 2014; Miera et al., 2019), incluindo na oliveira contra a gafa da oliveira (Preto et al., 2017).

A luta biológica através do uso de microrganismos endofíticos é feita com recurso a vários mecanismos, que podem ocorrer sucessivamente, simultaneamente ou sinergicamente (Lacava & Azevedo, 2014). A resistência/tolerância conferida pelos endófitos contra fitopatogénicos é amplamente atribuída à produção de metabolitos secundários por parte do endófito na planta hospedeira. Estes metabolitos podem, por exemplo, inibir diretamente o fitopatogénico por antibiose, parasitismo e competição por nutrientes e espaço; e indiretamente induzir o sistema de defesa da planta hospedeira (Castro et al., 2014). Contudo, este efeito protetor conferido pelos endófitos tem sido observado em plantas inoculadas com apenas uma única espécie endófito (revisado por Dutta et al., 2014). Tanto quanto é do nosso conhecimento, o uso de consórcios de microrganismos endófitos e o seu efeito na proteção das plantas contra doenças não foi ainda estudado. É reconhecido que a ação/função de um microrganismo depende das interações que estabelece com outros microrganismos presentes na mesma comunidade microbiana (Rovenich et al., 2014). Estas interações podem ser positivas (*e.g.*, cooperação) ou negativas (*e.g.*, competição) (Jakuschkin et al., 2016). Por exemplo, foi já demonstrado nalguns estudos que a capacidade de um patogénico em originar doença depende das interações que estabelece com outros microrganismos presentes na planta infetada, sejam interações de cooperação ou de competição (Kemen, 2014; Vayssier-Taussat et al., 2014). Alguns microrganismos, designados por “facilitador do patogénico”, ajudam o patogénico a infetar a planta hospedeira e/ou a aumentar a severidade da doença; Pelo contrário, outros microrganismos, designados por “antagonistas de patogénico”, reduzem a

população do patogénico e conseqüentemente o desenvolvimento da doença (Busby et al., 2016). Assim, a existência de um microrganismo num determinado microambiente resulta das interações benéficas e/ou deletérias exercidas por outros microrganismos presentes na comunidade microbiana (Jakuschkin et al., 2016). Face ao exposto, é expectável que a utilização de consórcios microbianos endófitos apresentem vantagens no aumento da eficiência da luta biológica face à utilização de um único isolado microbiano.

A aplicação de consórcios de microrganismos no tratamento de doenças tem sido mais testado no Homem. Os resultados obtidos até ao momento têm sido bastante promissores no tratamento de várias doenças, sobretudo as relacionadas com o trato intestinal. Por exemplo, foi já demonstrado a elevada eficácia do transplante de microbiota fecal de um dador saudável para um doente no tratamento de infeções bacterianas intestinais (Kelly et al., 2015; Wang et al., 2018). Este transplante de microbiota parece induzir a formação de uma flora intestinal dinamicamente saudável no organismo do receptor favorecendo a defesa natural do organismo (Backhed et al., 2012; Gupta et al., 2016; Hill et al., 2014). À semelhança dos Humanos, o transplante da comunidade microbiana endofítica de uma planta sã para uma planta doente apresenta um enorme potencial na luta contra doenças, mas que permanece ainda inexplorado. Em particular, o transplante de microbiota endofítica de plantas que apresentam um certo grau de tolerância/resistência a doenças poderá ser muito interessante neste âmbito. É expectável que, parte desta tolerância/resistência, possa advir da comunidade microbiana endofítica que coloniza a planta hospedeira. Plantas nativas e/ou não submetidas a um processo de melhoramento intensivo tendem a apresentar uma diversidade de microrganismos endofíticos superior às plantas cultivadas. Estudos recentes têm vindo a associar a ativação do sistema de defesa das plantas à elevada diversidade de microrganismos presentes na sua rizosfera (Mendes et al., 2011; 2013). Apesar de este efeito não ter sido ainda descrito para os microrganismos endófitos, pensa-se que estes microrganismos possam ter um papel importante no aumento de resistência das plantas às doenças. Desta forma, plantas de reservas ambientais, não melhoradas e até centenárias, podem ter a sua resistência a certas doenças associada a esta diversidade endofítica (Zahn & Amend, 2017). Na região de Mirandela identificou-se a presença de um exemplar de oliveira centenária que apresenta uma tolerância superior à tuberculose face às restantes árvores localizadas no mesmo olival. O uso da microbiota endofítica desta oliveira centenária poderá constituir uma opção eficiente e

sustentável na luta biológica contra a tuberculose da oliveira. Este inovador meio de luta requer, contudo, confirmação.

2. Material e Métodos

O material e métodos encontra-se dividido em duas subsecções de acordo com os objetivos definidos, de forma tornar a sua leitura mais compreensível.

2.1. Objetivo 1- Caracterizar a população fúngica associada a ramos, folhas e azeitonas que apresentem lesões pouco conhecidas e descritas na oliveira

Estudos que visam contribuir para o conhecimento e a identificação de novas doenças que afetam culturas agrícolas são geralmente iniciados pela descrição da sintomatologia e pela identificação do agente causal. Esta última envolve o isolamento do agente causal a partir do material vegetal que apresenta lesões, seguida pela sua identificação. Neste trabalho procedeu-se apenas à identificação de fungos como potenciais agentes causais das novas doenças que afetam a oliveira.

2.1.1. Colheita do material vegetal com lesões

A colheita de material vegetal foi efetuada em dois olivais localizados no concelho de Mirandela, no dia 26 de março de 2018. Um dos olivais está localizado em Suções (41°29'28.446" Norte, 7°15'41.494" Oeste) e o outro em Abambres (41°34'17.663" Norte, 7°10'54.682" Oeste). Ambos os olivais são constituídos maioritariamente pelas cultivares Madural, Verdeal Transmontana e Cobrançosa, e estão em modo de produção integrada. Em cada um dos olivais procedeu-se à prospeção de árvores que apresentavam mais de 50% da sua copa com ramos, folhas ou frutos com lesões não antes ou pouco descritos para a oliveira. Nestas árvores procedeu-se à colheita de material com lesões, sempre que possível dos quatro pontos cardeais. O material vegetal colhido foi colocado em sacos de plástico estéreis e transportados para o laboratório numa arca refrigerada a 4°C, para posterior análise.

2.1.2. Isolamento de fungos a partir do material com lesões

No laboratório, procedeu-se inicialmente à descrição das lesões nas amostras de ramos, folhas e frutos colhidos. Para cada uma das lesões identificadas selecionaram-se, aleatoriamente, duas amostras de material vegetal para isolamento de fungos. O isolamento de fungos a partir do material vegetal foi efetuado seguindo duas metodologias: i) cultura do material doente, e ii) diluição seriada em Placa de Petri. No primeiro método, o material vegetal com lesões foi lavado em água corrente e, após o seu corte em secções de 4 cm de comprimento, procedeu-se à sua esterilização superficial. O processo de desinfecção consistiu na imersão sequencial do material vegetal em lixívia (3-5% cloro ativo) durante 3 min seguido por três lavagens em água destilada estéril (1 min em cada imersão). Após remoção do excesso de água, o material vegetal foi cortado em segmentos (1 x 1 cm) e, em seguida, foram transferidos para Placas de Petri contendo meio de cultura de batata dextrose e agar (BDA) e 1 mL/L de ácido láctico 95,0% (Panreac AppliChem) para evitar o crescimento de bactérias.

No segundo método, cerca de 1 g de material vegetal com lesões foi colocado em 9 ml de solução tampão fosfato de potássio a pH 7,0 (8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 1,4 g/L de Na₂HPO₄; 0,24 g/L de KH₂PO₄) contendo Tween 80 (0,0025%, v/v). Após 1 min de agitação a 200 rpm, à temperatura ambiente, foram preparadas sucessivas diluições (1:10) da suspensão de microrganismos e, uma alíquota (100 µl) de cada diluição, foi utilizada para inocular Placas de Petri contendo meio de cultura BDA e 1 mL/L de ácido láctico 95,0% (Panreac AppliChem).

Para ambos os métodos, prepararam-se no total cinco Placas de Petri para cada lesão, que foram postas a incubar no escuro a 25 ± 2°C. O crescimento fúngico foi acompanhado diariamente e à medida que as colónias surgiam estas eram repicadas em meio BDA até obtenção de culturas puras.

2.1.3. Identificação molecular dos isolados fúngicos

A identificação de fungos foi feita com base na avaliação das características morfológicas das colónias, micélio e estruturas reprodutivas, complementado com a caracterização molecular. As características morfológicas das colónias estudadas foram: cor e textura, presença ou ausência de rebordo, zonação, rugosidade, elevação, produção de

exsudado e a sua cor. As colónias fúngicas com características morfológicas similares foram agrupadas e, um isolado de cada grupo, foi selecionado para se identificar molecularmente. A identificação molecular foi efetuada pela amplificação e sequenciação da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA nuclear ribossomal utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990) Para tal, procedeu-se inicialmente à extração de DNA de micélio fúngico utilizando o kit REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma-Aldrich). A 0,1 g de micélio, retirado de uma colónia com 7-15 dias de crescimento, foram adicionados 25 µL de tampão de extração. Após mistura, as amostras foram incubadas à temperatura de 95°C, durante 10 min, às quais foi adicionado em seguida 50 µl de solução diluição. A amplificação da região ITS foi efetuada usando o mesmo Kit da extração de DNA, no termociclador MyCycler (BioRad). A mistura da reação possuía 5µl tampão, 1 µl dNTP- mix, 1,5 µl MgCl₂ e 0,2 µl Taq polimerase, 1 µl de ITS1 (10 µM), 1 µl de ITS4 (10 µM), 36,3 µl água ultrapura e 4 µl de DNA. Foi ainda realizado um controlo negativo (sem DNA). O ciclo de temperaturas utilizado na amplificação foi 94°C durante 3 min (1 ciclo); 94°C durante 30 s, 53°C durante 50 s, 72°C durante 2 min (35 ciclos); e 72°C durante 10 min (1 ciclo). A qualidade do DNA amplificado foi avaliada por eletroforese, em tinas horizontais (BioRad), através de géis de agarose 1% (p/v) em 1x TAE, contendo 2µl de Gelred Nucleic Acid Stain (Biotium). As amostras de DNA amplificadas e o marcador molecular 1Kb (DNA Ladder, Promega) foram aplicados nos poços dos géis juntamente com 2 µL de Blue Loading Dye 4x (Promega). A separação eletroforética foi efetuada a uma diferença de potencial de 60 V e o DNA foi visualizado por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador ChemiDoc™XRS (BioRad).

As reações de sequenciação foram efetuadas recorrendo aos serviços da Macrogen (Espanha), utilizando os *primers* anteriormente descritos. As sequências de DNA obtidas (região ITS) foram analisadas utilizando o pacote de programas DNASTAR versão 2.58 (Lasergene). Recorrendo ao servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizando o algoritmo BLAST, foi analisada a homologia das sequências obtidas com outras sequências presentes na base de dados GenBank. Os resultados foram classificados de acordo com o maior grau de similaridade e o menor *E-value* (*Expected value*). Para sequências com valores de grau de identidade maiores que 98%, o género e as espécies foram aceites; para sequências com valores de grau de identidade entre 95% e 97%, apenas o género foi aceite, e para sequências com valores de grau de identidade menores que 95%, os isolados foram

classificados como fungos desconhecidos. Cada taxon fúngico foi classificado de acordo com o *Index Fungorum Database* (www.indexfungorum.org). Todos os isolados identificados molecularmente foram conservados a -80°C numa solução aquosa de glicerol a 30% (v/v).

2.1.4. Análise dos resultados

A diversidade e abundância de fungos foram determinadas para cada tipo de lesão. A abundância relativa (expressa em percentagem) foi calculada através do número de isolados obtidos para uma espécie fúngica dividido pelo número total de isolados obtidos.

2.2. Objetivo 2- Explorar a potencialidade do uso de um consórcio de microrganismos endófitos de oliveira centenária na luta biológica contra a tuberculose da oliveira

Este estudo envolve a extração da microbiota endofítica de oliveira centenária e a avaliação do efeito da inoculação de plantas de oliveira com esta microbiota quando aplicado individualmente ou em combinação com o patogénico *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Pss) no desenvolvimento da tuberculose.

2.2.1. Isolamento de microbiota endofítica de oliveira centenária

O isolamento da microbiota foi efetuado de uma oliveira centenária que apresenta tolerância à tuberculose (Fig. 2.1). Esta oliveira, localizada num olival com mais de 250 anos em Sucções (N 41° 29' 26.628"; W 7° 15' 31.219"), foi anteriormente caracterizada morfológicamente e geneticamente pelo nosso grupo de investigação (Rodrigues et al., 2018). A sua tolerância à tuberculose tem sido verificada ao longo dos anos pelo nosso grupo de investigação por exibir menor severidade desta doença face às restantes árvores do olival.



Figura 2.1. Aspeto geral da oliveira centenária utilizada para a extração da microbiota endofítica.

Na oliveira centenária selecionada foram colhidos ramos assintomáticos a 30 de julho de 2019, que foram colocados em sacos estéreis e transportados para o laboratório numa arca refrigerada a 4°C.

O isolamento da microbiota foi efetuado a partir dos ramos colhidos utilizando a metodologia previamente descrita por Ikeda et al. (2009), com algumas alterações. Para tal, após lavagem dos ramos em água corrente, procedeu-se à remoção das folhas e em seguida destacaram-se os raminhos, com o auxílio de um bisturi estéril, que apresentavam 2 a 4 mm de diâmetro. Estes raminhos foram em seguida submetidos a um processo de esterilização superficial de forma a eliminar a população microbiana epifítica. O processo de desinfecção, previamente otimizado, consistiu na imersão sequencial do material vegetal em etanol 70% (v/v) durante 2 min, hipoclorito de sódio (3-5% cloro ativo) durante 2 min, etanol 70% (v/v) durante 1 min, e três vezes em água destilada estéril (2 min em cada imersão). Para a extração da microbiota pesaram-se 100 gramas dos raminhos esterilizados para uma solução tampão BCE [2% Hexadecil Trimetil brometo de amónio, 0,1 M Tris HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0 e 1,4 M NaCl), que foram em seguida triturados e homogeneizados utilizando Homogenizador Turrax T25, à temperatura de 4°C. O homogeneizado obtido foi filtrado numa malha Miracloth, e o filtrado foi centrifugado a 1800 rpm (Eppendorf® Microcentrifuga modelo 5415R), durante 5 min a 10°C. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tudo e centrifugado a 6000 rpm (Eppendorf® Microcentrifuga modelo 5415R), durante 20 min a 10°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e o "pellet" foi suspenso em 50 ml

de BCE buffer por agitação no vortéx. Procedeu-se a uma nova filtragem para remoção de partículas insolúveis, seguida por uma centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min a 10°C. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi novamente homogeneizado em 50 ml de BCE, seguido por uma filtração. O filtrado obtido foi finalmente homogeneizado em 6 ml de 50 mM Tris HCl (pH 7,5) e combinada com 4 ml de solução de nycodenz (8 g de Nycodenz dissolvida em 10 ml de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5) e centrifugada a 9.000 rpm (Eppendorf® Microcentrifuga modelo 5415R), durante 40 min a 10°C. Após a centrifugação foi recolhida a solução de coloração branca ($\approx 500 \mu\text{L}$) que apareceu na interface entre a parte superior e inferior da amostra para um novo tubo (Fig. 2.2), ao qual foi adicionado o mesmo volume de água esterilizada. Esta solução, que contém a população microbiana endofítica, foi utilizada para inocular plântulas de oliveira. Parte desta solução foi conservada em glicerol (60%) a -80°C para futura análise da sua composição microbiana.

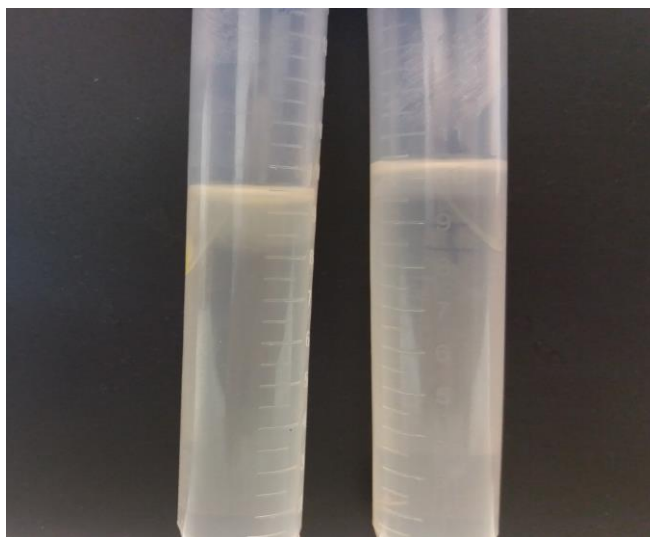


Figura 2.2. Aspeto da microbiota endofítica (banda de coloração esbranquiçada na zona de interface) extraída de ramos de oliveira centenária.

2.2.2. Inoculação de plântulas de oliveira

Nos ensaios de inoculação utilizaram-se plântulas de oliveira, com uma idade de cerca de 1 ano, da cultivar Cobrançosa, conhecida por ser suscetível à tuberculose. Para a sua obtenção utilizaram-se estacas semilenhosas, com cerca de 10 a 15 cm de comprimento e com 4 a 6 folhas. Após tratamento com ácido Indol-Butírico (AIB) a 0,8%, as estacas foram postas a enraizar em bancada com substrato de perlite, numa estufa da Escola Superior Agrária de

Bragança com sistema “cooling”. O enraizamento decorreu durante dois meses, sob condições de nebulização automática por períodos de 5 segundos e frequência de 10 minutos. Após o enraizamento, as plantas foram envasadas em sacos de polietileno preto de 1L de capacidade, contendo uma mistura de terra vegetal e turfa, e passaram para uma estufa de climatização onde permaneceram até aos ensaios de inoculação.

O fitopatogénico *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) foi fornecido pelo laboratório de AgroBiotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança. Para a obtenção do inóculo do fitopatogénico, retiraram-se da extremidade das colónias de Pss em meio LBA (Luria-Bertani agar) com 2 dias de crescimento, inóculo bacteriano que foi transferido para meio líquido LB. A incubação decorreu a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao fim de 24 horas, a concentração de células bacterianas foi ajustada, com o auxílio de um espectrofotómetro, de forma a dosear cerca de 10^6 células/mL que foi suspensa em solução tampão fosfato pH 7,0 e solução salina assim descrita por Penyalver em 2006 (Penyalver et al., 2006). Esta suspensão foi utilizada para inoculação de plântulas de oliveira.

No ensaio de inoculação estabeleceram-se seis tratamentos, cada um com 30 plântulas de oliveira como repetição: tampão- Plântulas inoculadas com uma solução de tampão fosfato com solução salina com pH 7,0 (controlo); microbiota- Plântulas inoculadas com microbiota endófitas; PSS- Plântulas inoculadas com Pss; microbiota e PSS- Plântulas inoculadas simultaneamente com microbiota endófitas e Pss; microbiota +1 semana PSS- Plântulas inoculadas com microbiota e após 1 semana inoculadas com Pss; microbiota + 5 semanas PSS- Plântulas inoculadas com microbiota e após 5 semanas inoculadas com Pss. Em cada plântula efetuou-se um corte na diagonal (em bisel) na superfície do caule principal, com um comprimento aproximado de 1 cm (Fig. 2.3a), onde se depositou 1µl do inóculo (microbiota e/ou Pss ou solução tampão; Fig. 2.3b). Em seguida, as porções das plântulas inoculadas foram envolvidas com “Parafilm” (Fig. 2.3c) para evitar desidratação e contaminações cruzadas. O ensaio decorreu em condições ambientais controladas, com uma humidade relativa de $70 \pm 5\%$ e temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$, durante 3 meses. As plântulas foram regadas manualmente sempre que necessário.

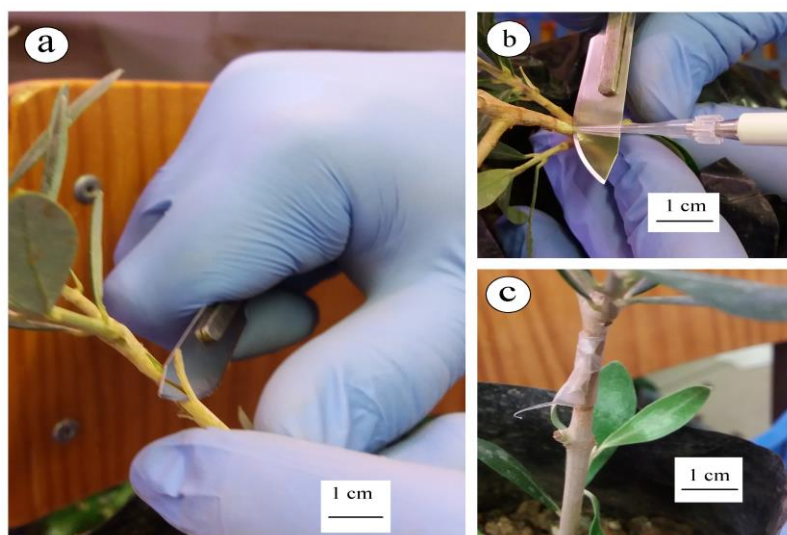


Figura 2.3. Aspeto geral do procedimento de inoculação. Corte em bisel do caule principal das plântulas de oliveira (a), onde se procedeu à inoculação da microbiota endófitas com ajuda de uma micropipeta (b), e sua proteção com parafilm (c).

2.2.3. Parâmetros avaliados

Após inoculação, foram feitas observações semanais, durante os 3 meses do ensaio, com o objetivo de se avaliar a incidência e severidade da tuberculose nos diferentes tratamentos.

A incidência da doença (%) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Incidência (I)} = \frac{\text{Número de plantas infetadas}}{\text{Número total de plantas testadas}} \times 100$$

A severidade da doença foi estimada pela avaliação da área doente. Para tal, foi utilizada uma escala de 1 a 6 previamente definida Penyalver (2006), para a tuberculose da oliveira, onde: 1 - ausência de sintomas; 2- ligeiro intumescimento no local da ferida; 3- pequeno nódulo na base do corte; 4- nódulo na base e no topo da ferida; 5- nódulo a cobrir completamente a ferida; 6- Nódulo maior que a ferida. Na figura 2.4 é mostrado o aspeto geral de cada uma destas 6 notas utilizada para avaliação da evolução da tuberculose.



Figura 2.4. Escala descritiva proposta por Penyalver (2006), para avaliar a severidade da tuberculose na oliveira: 1-ausência de sintomas; 2- ligeiro intumescimento no local da ferida; 3- pequeno nódulo na base do corte; 4- nódulo na base e no topo da ferida; 5- nódulo a cobrir completamente a ferida; 6- Nódulo maior que a ferida.

A área sob a curva de progresso da doença nos diferentes tratamentos foi determinada usando os dados de incidência ($ASCPD_i$) e severidade ($ASCPD_s$). A $ASCPD_i$ foi calculada pela expressão:

$$ASCPD_i = \sum_{i=1}^n [(I_{i+1} + I_i)/2](t_{i+1} - t_1)$$

onde I é a incidência (%) observada em duas avaliações consecutivas (i e $i+1$), t é o intervalo de tempo entre as avaliações, e n é o número total de observações (Moral et al., 2008).

A $ASCPD_s$ foi calculada como a área sob a curva do índice de severidade da doença (ID) ao longo do tempo, sendo a estimativa de ID dada pela seguinte fórmula:

$$ID = \left(\sum ni/i \right) \times N$$

onde i representa a severidade (na escala de 0 a 6), ni é o número de árvores com a severidade i, e N é o número total de árvores (Moral et al., 2008).

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA com efeitos fixos e distribuição normal, e um nível de significância de 0,05. A comparação das médias efetuou-se recorrendo ao teste de Tukey HSD considerando $p < 0,05$ (significativo), $p < 0,01$ (muito significativo) e $p < 0,001$ (altamente significativo), no programa SPSS versão 20.

3. Resultados e Discussão


À semelhança do efetuado no material e métodos, optou-se por apresentar os resultados e a sua discussão de acordo com os objetivos definidos.

3.1. Objetivo 1- Caracterizar a população fúngica associada a ramos, folhas e azeitonas que apresentem lesões pouco conhecidas e descritas na oliveira




3.1.1. Descrição morfológica das lesões

A análise do material vegetal com lesões permitiu identificar um total de sete sintomatologias diferentes podendo cada uma delas corresponder a uma potencial nova doença. A maioria das lesões foram identificadas em folhas (5), enquanto que nos frutos e nos ramos foi identificado apenas uma. A descrição morfológica de cada lesão, nos diferentes órgãos, encontra-se descrita no Quadro 3.1.

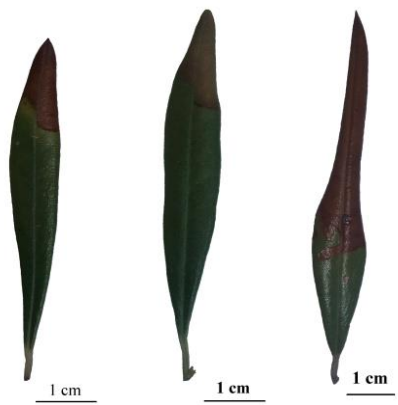


Quadro 3.1. Aspeto macroscópico das lesões nos diferentes órgãos (ramos, folhas e azeitonas) e sua descrição morfológica.

Lesão	Aspeto macroscópico da lesão nos diferentes órgãos	Descrição morfológica
1		Lesões necróticas irregulares, de coloração preta ou parda, que se tornam secas e deprimidas. Em geral, aparecem dispersas em todo o limbo.

Quadro 3.1. Aspeto macroscópico das lesões nos diferentes órgãos (ramos, folhas e azeitonas) e sua descrição morfológica (continuação).

Lesão	Aspeto macroscópico da lesão nos diferentes órgãos	Descrição morfológica
2	 <p>Three olive leaves are shown side-by-side. Each leaf has a small, dark reddish-brown necrotic lesion at its apex. Below each leaf is a horizontal scale bar labeled '1 cm'.</p>	Lesões necróticas irregulares, de coloração avermelhada, que podem coalescer formando manchas de maior diâmetro. Surgem maioritariamente na parte superior do limbo (1/2 superior do limbo).
3	 <p>A single olive leaf is shown vertically. It has several small, dark, necrotic lesions distributed along its entire length. Below the leaf is a horizontal scale bar labeled '1 cm'.</p>	Lesões necróticas, circulares, de coloração esbranquiçada, distribuídas em toda a extensão do limbo.
4	 <p>A single olive fruit is shown. It has a circular, sunken, dark brown necrotic lesion on its surface. Below the fruit is a horizontal scale bar labeled '1 cm'.</p>	Lesão necrótica, circular, deprimida, de cor castanho-escuro, limitada por uma borda mais escura, que acaba por causar a mumificação total ou parcial e a queda do fruto.

Quadro 3.1. Aspeto macroscópico das lesões nos diferentes órgãos (ramos, folhas e azeitonas) e sua descrição morfológica (continuação).

Lesão	Aspeto macroscópico da lesão nos diferentes órgãos	Descrição morfológica
5		<p>Ápice do limbo necrosado, com uma coloração castanho-avermelhada, que acaba por se expandir por todo o limbo, causando a morte e queda da folha.</p>
6		<p>Lesão necrosada, circular, de coloração esbranquiçada e opaca, com as bordas circulares pretas.</p>
7		<p>Lesão necrótica, de forma irregular, e coloração branca a vermelha acastanhada.</p>

3.1.2. Isolamento e identificação dos isolados fúngicos associados às lesões

Do total de segmentos que apresentavam lesões (ramos, folhas e frutos) foram isolados vários fungos. Colónias puras destes isolados foram, posteriormente, agrupados de acordo

com a sua similaridade nas características morfológicas e estruturas de reprodução fúngicas. Este procedimento permitiu identificar um total de 13 morfoespécies. De entre estes, foi possível identificar uma morfoespécie até ao género (*Penicillium* sp.) com base nas suas características morfológicas. Das restantes morfoespécies foi possível identificar nove até à espécie e duas até ao género, pela amplificação e sequenciação da região ITS do rDNA (Quadro 3.2). Das morfoespécies identificadas até à espécie, duas delas correspondiam à mesma espécie. A identificação molecular não permitiu, contudo, identificar duas morfoespécies. As espécies fúngicas identificadas neste estudo pertenciam ao filo Ascomycota, e a oito famílias, nomeadamente Dermateaceae (géneros *Phlyctema* e *Neofabraea*), Dothioraceae (género *Hormonema*), Saccoteciaceae (género *Aureobasidium*), Didymellaceae (géneros *Phoma* e *Epicoccum*), Sclerotiniaceae (géneros *Botrytis* e *Sclerotinia*), Valsaceae (género *Cytospora*), Pestalotiopsidaceae (género *Pestalotiopsis*) e Aspergillaceae (género *Penicillium*).

Quadro 3.2. Espécies fúngicas identificadas após comparação das sequências obtidas com as do banco de dados do GenBank, por meio do Blastn com a espécie de maior identidade (%).

Espécie	Nº de acesso	Máxima Identidade (%)	E-value*
<i>Phlyctema vagabunda</i> Desm. NA. <i>Neofabraea vagabunda</i> (Desm.) Rossman	KT923789.1	99	0.0
<i>Neofabraea alba</i> (E.J. Guthrie) Verkley NA. <i>Neofabraea vagabunda</i> (Desm.) Rossman	KP903614.1	99	0.0
<i>Hormonema</i> sp.	JF705951.1	99	0.0
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud	KX067792.1	98	0.0
<i>Botrytis</i> sp.	KT224806.1	97	0.0
<i>Phoma macrostoma</i> Mont. NA. <i>Didymella macrostoma</i> (Mont.) Qian Chen & L. Cai	LN714588.1	99	0.0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	KM211693.1	99	0.0
<i>Cytospora pruinosa</i> (Fr.) Sacc. NA. <i>Valsa cypri</i> (Tul.) Tul. & C. Tul.	KU973711.1	99	0.0

<i>Fungal</i> sp.	KF735045.1	98	0.0
<i>Uncultured fungus</i>	GQ999160.1	95	0.0
<i>Pestalotiopsis besseyi</i> (Guba) Nag Raj	HM037979.1	99	0.0
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	HM037979.1	98	0.0

* *E-value* - número esperado de falsos positivos, logo, quanto menor o seu valor menor a probabilidade do resultado ser consequência do acaso.

NA – Nome atual

3.1.3. Comunidade fúngica associada a cada tipo de lesão

Para cada lesão foi identificada a comunidade fúngica associada, cuja abundância relativa das espécies se encontra representada na Figura 3.1. Os resultados obtidos mostram que *A. pullulans*, *Penicillium* sp. e *E. nigrum* surgiram em todas as lesões analisadas tendo, a primeira espécie, sido a mais abundante (abundância relativa superior a 45%). *Aureobasidium pullulans* é uma levedura ubíqua, que ocorre numa grande variedade de ambientes, incluindo solo e água (Gaur et al., 2010). A sua presença em diversas espécies de plantas, quer na forma epifítica como endofítica, foi já reportada por diversos autores (Janisiewicz et al., 2010; Mcgrath & Andrews, 2007), incluindo na oliveira (Gomes et al., 2018). Trata-se de uma espécie descrita como sendo saprófita (Zhao et al., 2013) havendo, contudo, relatos escassos de que possa ser patogénica para o Homem (Zalar & Gunde-cimerman, 2016). A grande abundância desta espécie na filosfera da oliveira (ramos, folhas e frutos) pode estar relacionada com a sua capacidade de sobreviver às condições ambientais extremas (temperatura e luz ultravioleta), devido às suas hifas melanizadas. A melanina produzida por esta espécie tem sido descrita como tendo um papel importante na proteção contra a lise celular causada pela irradiação solar e a luz ultravioleta (Franzen et al., 1999). A capacidade desta espécie em produzir igualmente uma grande variedade de enzimas, antibióticos e polissacarídeos tem permitido a sua exploração biotecnológica na área alimentar, farmacêutica e na indústria de produção de plástico biodegradável (Zeng et al., 2019). *Aureobasidium pullulans* também tem sido descrita como sendo um potencial agente de luta biológica contra doenças que afetam diversas culturas, em especial na fase de pós-colheita (Gaur et al., 2010). Adicionalmente, esta espécie demonstrou ser efetiva contra *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifera* que causam doenças na videira, e contra podridões causadas por *B. cinerea* em kiwi, cerejeira, tomateiro, macieira e

morangueiro (Schena et al., 1999; 2003). Na atualidade existe no comércio um biofungicida contra a Podridão cinzenta dos cachos da videira, causado por *B. cinerea*, com a designação BOTECTOR®, em cujo princípio ativo é *A. pullulans* (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, 2015).

A presença de espécies do género *Penicillium* em diversos órgãos da oliveira foi anteriormente descrita por diversos investigadores (Preto et al., 2016; Cameirão et al., 2018; Gomes et al., 2018). Estas espécies incluem *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. swiecickii* (Pereira, 2014). No presente estudo *Penicillium* spp. surgiu com uma abundância relativa superior a 45% (Fig. 3.1). Não foram encontrados trabalhos demonstrando a patogenicidade do género *Penicillium* na oliveira, tendo a maioria dos trabalhos descrito este género como sendo saprófita (Zhao et al., 2013).

Epicoccum nigrum foi isolado de todas os grupos sintomatológicos com uma abundância relativa variando de 3 a 12%, obtida nas lesões 3 e 2, respetivamente (Fig. 3.1). Encontra-se descrito como endófito da oliveira (Torbati et al., 2014; Malacrino et al., 2015).

A presença de *Fungal* sp. foi de igual modo observada em todas as lesões analisadas à exceção da lesão 4 identificada nos frutos (Fig. 3.1). Este resultado sugere tratar-se de um fungo ubíquo e abundante nas folhas e ramos da oliveira. O fungo *Hormonema* sp. surgiu associado apenas às lesões 2, 5 e 6 identificadas nas folhas, com uma abundância relativa de cerca de 3%. Tanto quanto é do nosso conhecimento, a capacidade desta espécie em causar doenças nas plantas ainda não foi reconhecida. Por exemplo, a inoculação de *Abies alba* com *Hormonema carpetanum* não originou nenhum sintoma de doença, e nem permitiu o reisolamento do fungo, pois o *H. carpetanum* já havia sido isolado junto com outros microorganismos da *A. alba*. (Jankowiak & Bila, 2016). Várias espécies pertencentes ao género *Hormona* têm sido descritas como possuindo propriedades antifúngicas contra *Candida* e *Aspergillus* (Peláez et al., 2000). A capacidade de fungos deste género em produzir enzimas responsáveis pela degradação da celulose, têm despertado o interesse da sua utilização na indústria do papel (Martín & Eugenio, 2016).

A espécie *S. sclerotiorum* foi encontrada nas lesões 1, 2, 5 e 6 descritas nas folhas, com uma abundância relativa a variar entre 1,5 % (lesão 6) e 5% (lesão 5) (Fig. 3.1). Este fungo é um dos mais importantes patogénicos no mundo, sendo responsável por causar podridões em mais de 75 famílias de plantas, incluindo girassol, feijão, tabaco, tomate, soja, entre outros

(Villas & Leite, 2005). Na oliveira, foi recentemente reportado a capacidade desta espécie fúngica em infectar azeitonas das cultivares Frantoio e Picholine, num olival em Monopoli (sul de Itália), causando a sua podridão (Ruano-Rosa et al., 2017). Tanto quanto é do nosso conhecimento, a capacidade de *S. sclerotiorum* em infectar folhas de oliveira ainda não foi reportado.

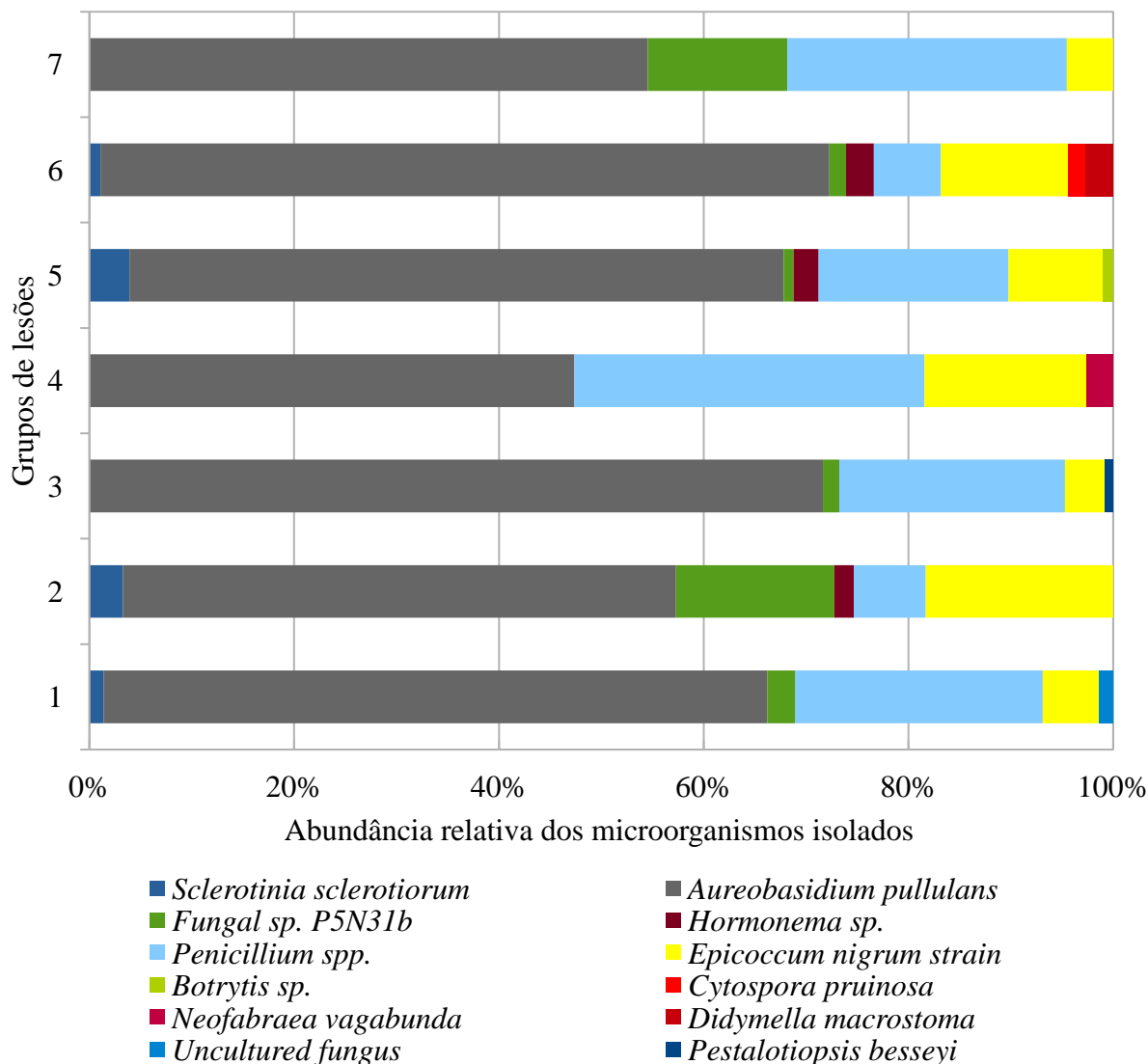


Figura 3.1. Abundância relativa (%) das diferentes espécies fúngicas nos sete grupos de lesões identificados neste estudo.

A presença de *Neofabraea vagabunda* (sin. *Phlyctema vagabunda* e *Neofabraea alba*) foi detetada unicamente na lesão 4, identificada nos frutos (Fig. 3.1). Esta espécie, com uma

abundância relativa de 3%, encontra-se já descrita como sendo o agente causal da lepra da oliveira (Roca et al., 2007). Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1907 na região da Toscana, Itália (Petri, 1907). Hoje, está presente em várias regiões olivícolas (Rooney-Latham et al., 2013). Na Península Ibérica, só recentemente foi reportada a sua presença (Romero et al., 2016; 2018). Esta doença afeta sobretudo os frutos. Quando infetados apresentam lesões necróticas circulares, deprimidas, de cor castanho escuro, limitadas por uma borda mais escura, acabando por provocar a mumificação e a queda do fruto (Roca et al., 2007). Recentemente, este fungo também demonstrou capacidade em infetar ramos de oliveira causando cancro (Romero et al., 2016). A lepra da oliveira é uma doença muito pouco investigada, não se conhecendo o ciclo epidemiológico nas condições europeias.

Botrytis sp. foi encontrado apenas na lesão 5, que se caracteriza pela extremidade superior da folha necrosada (Fig. 3.1). Este fungo é sobejamente conhecido por ser o agente causal de doenças de podridão em várias espécies de plantas (Pereira et al., 2014). É um fungo com bastante abrangência sendo encontrado em várias partes do mundo, causador também da podridão cinzenta da uva (Zhang et al., 2018). Não foram encontrados trabalhos comprovando tratar-se de um patogénico para a oliveira.

A presença de *P. macrostoma* e *C. pruinosa* foi detetada unicamente na lesão 6, com uma abundância relativa de 2% e 3%, respetivamente (Fig. 3.1). As manchas circulares de coloração esbranquiçada características da lesão 6 poderão resultar da presença do fungo *P. macrostoma*. Esta espécie é conhecida por produzir macrocidina (*i.e.*, ácido 3-aciltetrâmico) que induz o aparecimento de clorose através da inibição de carotenoides (Hubbard et al., 2016). No que concerne ao fungo *Cytospora pruinosa*, apenas foi encontrado na literatura a indicação da sua capacidade em causar a desfolha em oliveiras da cultivar Gordal Servillana e Africana, em Espanha (Moral et al., 2017).

A patogenicidade das espécies fúngicas identificadas neste trabalho, em especial das que surgiram unicamente associadas a uma das lesões (*i.e.*, *N. vagabunda*, *Botrytis* sp., *P. macrostoma* e *C. pruinosa*), deverá ser confirmada com ensaios de inoculação de material vegetal e posterior reisolamento do fitopatogénico das lesões formadas.

3.2. Objetivo 2 - Explorar a potencialidade do uso de um consórcio de microrganismos endófitos de oliveira centenária na luta biológica contra a tuberculose da oliveira

Em seguida são apresentados os resultados do efeito da inoculação de plântulas de oliveira da cv. Cobrançosa com microbiota endófito extraída de uma oliveira centenária, com reconhecida tolerância à tuberculose, na incidência e severidade da tuberculose. Neste estudo avaliou-se o efeito desta microbiota endófito quando inoculada simultaneamente ou antes (uma e cinco semanas) o patogénico Pss. Utilizaram-se como controlo positivo plântulas inoculadas com Pss e como controlo negativo plântulas inoculadas com tampão. Para comprovar que a microbiota endófito não exerce qualquer efeito negativo na oliveira foi incluído, ainda neste estudo, um tratamento que envolveu a inoculação de plântulas com microbiota endófito.

3.2.1. Incidência

Na Figura 3.2 encontram-se representadas as áreas sob a curva de progresso da doença nos diferentes tratamentos usando os dados de incidência (ASCPDi). Apesar desta avaliação ter sido efetuada para os 3 meses da duração do ensaio, apenas são apresentados os resultados até aos 35 dias, uma vez que a partir desta data não se registaram mais alterações. Os resultados mostram que plântulas inoculadas com tampão (controlo negativo) e com microbiota endófito, não desenvolveram sintomatologia típica da tuberculose durante a realização do ensaio. Assim, tal como esperado, a microbiota endófito parece não exercer qualquer efeito deletério na planta hospedeira. A microbiota endófito mostrou proteger a planta hospedeira contra potenciais infeções do patogénico Pss. De fato, a inoculação de plantas com microbiota endófito, uma e cinco semanas antes da inoculação Pss permitiu reduzir significativamente ($p < 0,001$) a incidência da doença face ao controlo positivo (plantas inoculadas com Pss), em especial após os 24 dias de inoculação com Pss. Contudo, quando aplicada simultaneamente com o Pss, a microbiota endófito não permitiu reduzir significativamente a incidência da doença face às plantas inoculadas com Pss. Assim sendo, o efeito benéfico da microbiota endófito só se revelou quando o estabelecimento deste consórcio microbiano na planta hospedeira ocorria previamente à infeção com Pss. Os resultados obtidos sugerem que, apesar da microbiota endófito ter demonstrado a capacidade de reduzir a infeção por Pss, parece apresentar baixa ação competitiva contra Pss,

necessitando de se estabelecer previamente na planta hospedeira para poder exercer o seu efeito benéfico. Esta hipótese necessita, contudo, de confirmação pela análise da evolução da composição microbiana endófito ao longo da duração do ensaio. Esta análise encontra-se a decorrer neste momento o que nos permitirá tirar conclusões com maior exatidão.

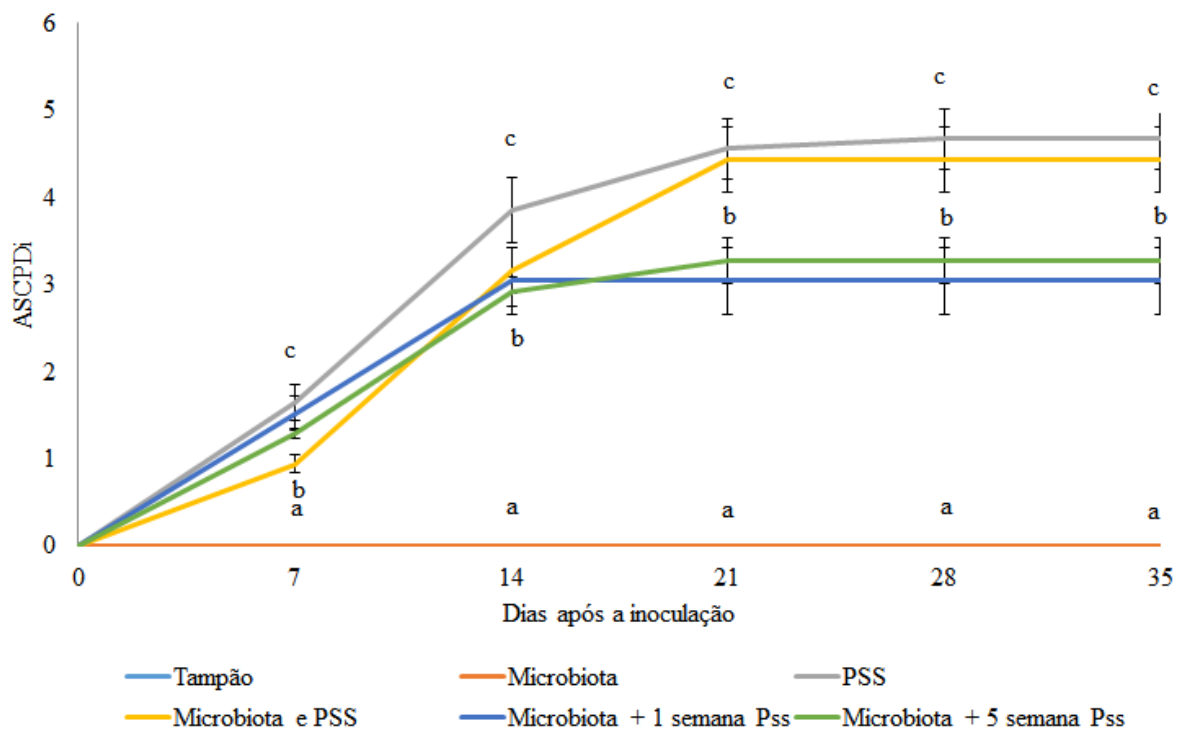


Figura 3.2. Áreas sob a curva de progresso da tuberculose da oliveira nos diferentes tratamentos usando os dados de incidência (ASCPDi). Tratamentos: Tampão- Plântulas inoculadas com uma solução de tampão; Microbiota- Plântulas inoculadas com microbiota endófito; PSS- Plântulas inoculadas com Pss; Microbiota e PSS- Plântulas inoculadas simultaneamente com microbiota endofítica e Pss; Microbiota +1 semana PSS- Plântulas inoculadas com microbiota e após 1 semana inoculadas com Pss; Microbiota + 5 semanas PSS- Plântulas inoculadas com microbiota e após 5 semanas inoculadas com Pss. Valores médios registados para cada tratamento seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$, para cada dia analisado.

3.2.2. Severidade

No que concerne à severidade, os resultados da ASCPDs (Fig. 3.3) mostram que a aplicação da microbiota endófitas reduziu significativamente ($p < 0,05$) o desenvolvimento da tuberculose em relação às plantas inoculadas exclusivamente com Pss. Este efeito foi mais notório quando a microbiota foi aplicada uma ou cinco semanas antes do Pss ($p < 0,001$). Quando aplicada simultaneamente com o Pss, o efeito inibitório da microbiota no desenvolvimento da tuberculose foi notório sobretudo após os 42 dias de inoculação. Estes resultados sugerem que a microbiota endófitas exibe um efeito curativo ao reduzir o desenvolvimento da tuberculose quando aplicado quer simultaneamente ou antes do Pss.

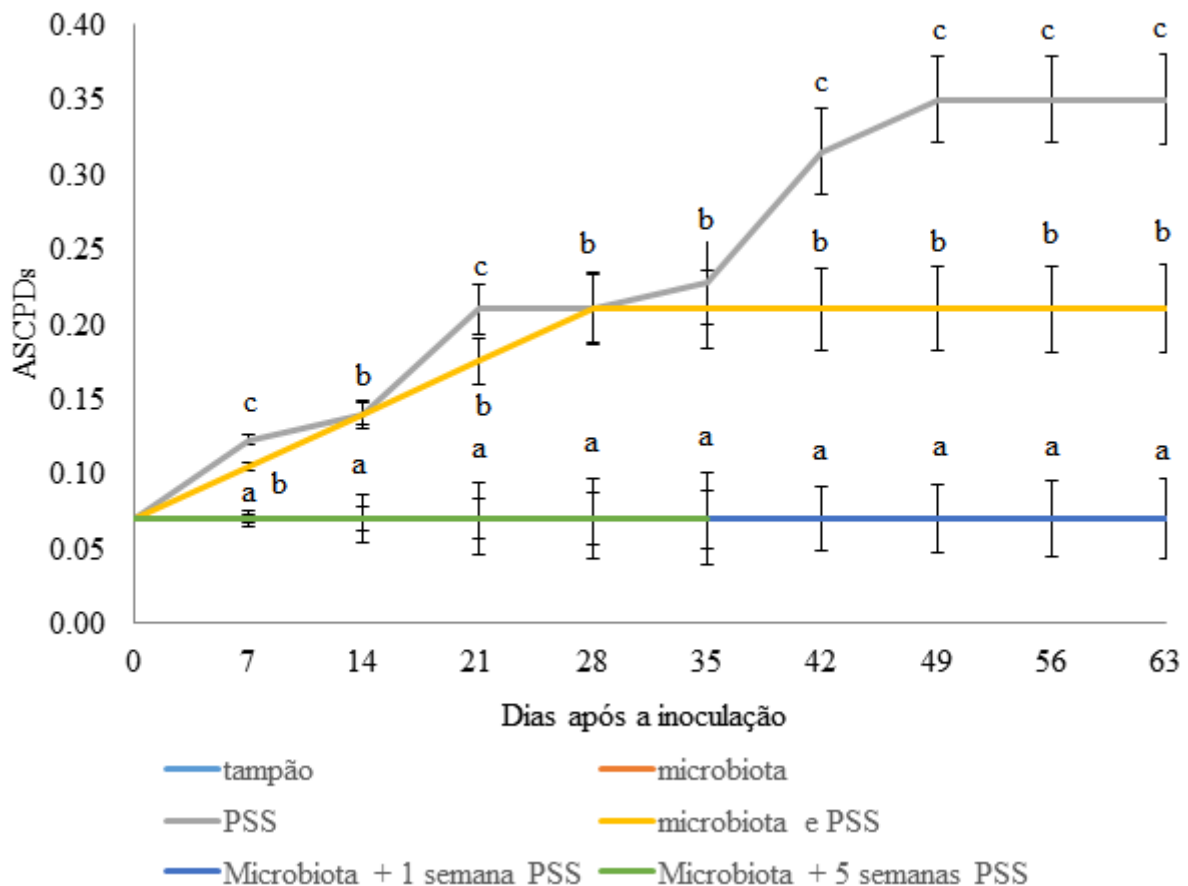


Figura 3.3. Áreas sob a curva de progresso da tuberculose da oliveira nos diferentes tratamentos usando os dados de severidade (ASCPDs). Tratamentos: Tampão- Plântulas inoculadas com uma solução de tampão; Microbiota- Plântulas inoculadas com microbiota endófitas; PSS- Plântulas inoculadas com Pss; Microbiota e PSS- Plântulas inoculadas

simultaneamente com microbiota endofítica e Pss; Microbiota +1 semana PSS- Plântulas inoculadas com microbiota e após 1 semana inoculadas com Pss; Microbiota + 5 semanas PSS- Plântulas inoculadas com microbiota e após 5 semanas inoculadas com Pss. Valores médios registados para cada tratamento seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$, para cada dia analisado.

4. Conclusões

4.1 Conclusões do primeiro objetivo

- 1) No total identificaram-se sete lesões diferentes podendo cada uma delas corresponder a uma potencial nova doença
- 2) A maioria das lesões foi identificada em folhas, que apresentavam como principais características manchas de diferentes formas e colorações, que podiam estar dispersas ou concentradas numa parte do limbo. Nos frutos e nos ramos foi identificado apenas uma lesão.
- 3) As sete lesões apresentaram uma composição de fungos similar. Contudo, algumas das espécies identificadas exibiram especificidade por uma determinada lesão sugerindo que possam ter um papel importante no desenvolvimento destas lesões. *Neofabraea vagabunda*, reconhecido como sendo o agente causal da lepra da oliveira, foi exclusivo de lesões que surgiram no fruto. *Botrytis* sp., *Phoma macrostoma* e *Cytospora pruinoso*, tiveram ocorrência exclusiva em lesões em folhas. A capacidade destas espécies em causar doença na oliveira requer confirmação pela aplicação dos postulados de Koch.

4.2 Conclusões do segundo objetivo

- 1) A utilização da microbiota endófito de oliveiras com tolerância à tuberculose apresenta um elevado potencial na luta biológica contra a tuberculose limitando consideravelmente os seus sintomas.
- 2) A aplicação desta microbiota parece ser bastante promissora como estratégia curativa (ao reduzir o desenvolvimento da doença) e preventiva (ao reduzir o número de plantas infetadas pelo patogénico Pss).
- 3) Este efeito benéfico da microbiota na oliveira revelou ser superior quando a inoculação com a microbiota ocorria previamente à inoculação com Pss e não tem diferença estatística se for 1 ou 5 semanas antes. Os mecanismos de ação destes microrganismos contra o agente causal da tuberculose deverá ser estudado no futuro.

Referências bibliográficas

- Buonaurio R., Moretti C., Passos da Silva D., Cortese, C., Ramos, C., Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant. *Frontiers in Plant Science*, 6(434): 1–12.
- Busby, P. E., Ridout, M., Newcombe, G. (2016). Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology*, 90(6): 645–655.
- Cameirão, C. (2018). Exploitation of plant microbiota in the development of new approaches to manage *Xylella fastidiosa* and its insect vectors. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biotecnológica no Instituto Politécnico de Bragança.
- Castro, R. A., Quecine, M.C., Lacava, P.T., Batista, B.D., Luvizotto, D.M., Marcon, J., Azevedo, J.L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*, 3:382.
- COI (2018). The Olive Tree - International Olive Council. Retrieved January 17, 2019, from <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/76-the-olive-tree>
- Deshmukh, S. K. (2018). Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. *Journal of Fungi (Basel)*, 4(3): 4-77.
- Dutta, D., Puzari, K. C., Gogoi, R., Dutta, P. (2014). Endophytes: Exploitation as a Tool in Plant Protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5): 621-629.
- Estatísticas Agrícolas (2017). Instituto Nacional de Estatística. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_base_dados Acedido a 17 de janeiro de 2019.
- Franzen, A. J., Souza, W. De, Farina, M., Alviano, C. S., (1999). Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*, 173(2): 395–402.
- Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Backhed, F. (2012). Perspective Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Elsevier*, 12(5): 611–622.

- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M., Gaur, M. K. (2010). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*, 9(47): 7989–7997.
- Gomes, T., Pereira, J. A., 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(3): 668–679.
- Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., Xiao, J. (2018). Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochemistry Reviews*, 17(5): 1091–1110.
- Gupta, S., Allen-Vercoe, E., & Petrof, E. O. (2016). Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 9(2): 229–239.
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterol & Hepatol*, 11: 506-514.
- Hubbard, M., Taylor, W. G., Bailey, K. L., & Hynes, R. K. (2016). The dominant modes of action of macrocidins, bioherbicidal metabolites of *Phoma macrostoma*, differ between susceptible plant species. *Environmental and Experimental Botany*, 132(12): 80–91.
- Hyde, K., Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.
- Ikeda, S., Kaneko, T., & Okubo, T. (2009). Development of a Bacterial Cell Enrichment Method and its Application to the Community Analysis in Soybean Stems. *Microbial Ecology*, 58(4): 703–714.
- Jakuschkin, B., Fievet, V., Schwaller, L., Fort, T., Robin, C., & Vacher, C. (2016). Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Microbial Ecology*, 72(4): 870–880.
- Janisiewicz, W., Kurtzman, C. P., & Buyer, J. S. (2010). Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*, 27(7): 389–398.

- Jankowiak, R., & Bila, P. (2016). Fungi associated with dieback of *Abies alba* seedlings in naturally regenerating forest ecosystems. *Fungal Ecology*, 24: 61–69.
- Kelly, C. R., Kahn, S., Kashyap, P., Laine, L., Rubin, D., Atreja, A., Wu, G. (2015). Update on Fecal Microbiota Transplantation: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology*, 149(1): 223–237.
- Kemen, E. (2014). Science Direct Microbe: microbe interactions determine oomycete and fungal host colonization. *Current Opinion in Plant Biology*, 20: 75–81.
- Krid, S., Rhouma, A., Mogou, I., Quesada, J., Nesme, X., Gargouri, A. (2010). *Pseudomonas savastanoi* endophytic bacteria in olive tree knots and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Plant Pathology*, 92(2): 335-341.
- Lopes, J. I, Pinto J. F. S. (2010). Tuberculose da oliveira. Direção Regional e Agricultura de pescas do Norte, ficha técnica número 35: 1-3.
- Malacrino, A. Schena, L. Campolo, O. Laudani, F. (2015). Molecular analysis of the fungal microbiome associated with the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Fungal Ecology*, 18: 67–74.
- Maldonado-gonzález, M. M., Prieto, P., Ramos, C., Mercado-blanco, J. (2013). From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 6(3): 275-287.
- Martín, J. A., Eugenio, M. E. (2016). Potential of the new endophytic fungus *Hormonema* sp. CECT-13092 for improving processes in lignocellulosic biorefineries: biofuel production and cellulosic pulp manufacture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(5): 997-1005.
- Mcgrath, M. J., Andrews, J. H. (2007). Role of Microbial Immigration in the Colonization of Apple Leaves by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and environmental Microbiology* 73(4): 1277–1286.

- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology reviews*, 37(5): 634-663.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., Voort, M., Schneider, J., M Raaijmakers, J. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332(6033): 1097-1100.
- Miao, G., Han, J., Zhang, K., Wang, S., Wang, C. (2019). Protection of melon against *Fusarium* wilt-root knot nematode complex by endophytic fungi *Penicillium brefeldianum* HS-1. *Symbiosis*, 77(1): 83–89.
- Miera, D., Garzo, E., Jose, J., Id, R. C. (2019). Developing tools for evaluating inoculation methods of biocontrol *Streptomyces sp.* strains into grapevine plants. *Public Library of Science*, 14(1): 1–18.
- Moral, J., Agustí-Brisach C., Pérez-Rodríguez M., Xaviér C., Carmen Raya M., Rhouma A., Trapero A. (2017). Identification of Fungal Species Associated with Branch Dieback of Olive and Resistance of Table Cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 101(2): 306–316.
- Moral, J., Bouhmidi, K., Trapero, A. (2008). Influence of Fruit Maturity, Cultivar Susceptibility, and Inoculation Method on Infection of Olive Fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 92(10): 1421–1426.
- Moral, J., Trapero-Casas, A. (2009). Assessing the Susceptibility of Olive Cultivars to Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 93(10): 1028-1036.
- Navero, D., Escobar, R., Romero, L. (2017). *El cultivo del olivo* 7 ed. Mundi-Prensa, 1008 ppg
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J. M., Salcedo, C. I., López, M. M. (2006). Factors Affecting *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* Plant Inoculations and Their Use for Evaluation of Olive Cultivar Susceptibility. *Phytopathology*, 96(3): 313–319.
- Pereira, J. A., Bento, A. (2011). *Actas do Workshop em Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*.

- Pereira, R. M. G. (2014). Caracterização da população microbiana endo-e epifítica em azeitonas de cultivares Transmontanas. Dissertação em Qualidade e Segurança alimentar, 1: 1-75.
- Preto, G. (2016). Microbial community of olives and its potential for biological control of olive anthracnose. Dissertação de Mestrado, Escola Superior Agrária de Bragança.
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J. A., 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.
- Quesada. J. M., Penyalvera R., Perez-Panade J., Salcedo C. I., Lopez E. A., (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, 59(2): 262–269.
- Roca, L., Moral, J., J. R., V., A, Á., Oliveira, R., & Trapero-Casas, A. (2007). Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea*, 26: 48-50.
- Rodrigues N. (2018). Characterization of wild and centenarian olive trees for their valorization. PhD Thesis
- Rokni-Zadeh, H., Khavazi, K., Asgharzadeh, A., Hosseini Mazinani, M., Mot, R. (2008). Biocontrol of *Pseudomonas savastanoi*, causative agent of olive knot disease: antagonistic potential of non-pathogenic rhizosphere isolates of fluorescent *Pseudomonas*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*,73(1): 199-203.
- Romero, J., C. Raya, M., Roca, L., Moral, J., Trapero-Casas, A. (2016). First Report of *Neofabraea vagabunda* Causing Branch Cankers on Olives in Spain. *Plant Disease* 100(2): 527.
- Romero, J., Raya, M. C., Roca, L. F., Agust, C. (2018). Phenotypic, molecular and pathogenic characterization of *Phlyctema vagabunda*, causal agent of olive leprosy. *Plant Pathology*, 67(2): 277–294.
- Rooney-Latham, S., Gallegos, L., Vossen, P., Gubler, W. (2013). First Report of *Neofabraea alba* Causing Fruit Spot on Olive in North America. *Plant Disease*, 97(10): 1384.

- Rovenich, H., Boshoven, J. C., Thomma, B. P. H. J. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Plant Biology*, 20: 96–103.
- Ruano-Rosa, D., Minutillo, S. A., Nicosia, M. G., Li Destri;Agosteo, G. E.;Schena, L. (2017). First Report of *Sclerotinia sclerotiorum* Associated with Olive Fruit Rot in Italy. *Plant Disease*, 101(6): 1040–1040.
- Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3): 189–199.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., Ippolito, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30(3): 209-220.
- Soliman, M., Combs, C., Rosenberger, T. (2012). Modulation of Inflammatory Cytokines and Mitogen-activated Protein Kinases by Acetate in Primary Astrocytes. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8(1): 287-300.
- Torbati, M., Arzanlou, M., Azadmard-damirchi, S., Alijani, S. (2014). Effect of fungal species involved in the olive fruit rot on the qualitative properties of olive oil. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(3): 292-297.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J. F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(29): 1-7.
- Verlag, F., Pelaez, F., Cabello, A., Platas, G., Diezt, M. T., Gonzalez, A., Flattery, A. M. Y. M. (2000). The Discovery of Enfumafungin a Novel Antifungal Compound Produced by an Endophytic *Hormonema* Species Biological Activity and Taxonomy of the Producing Organisms. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(3): 333–343.
- Villas, R. M., Leite, C. (2005). Comunicado Técnico. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, 76: 1–3.

- Wang, J., Kuo, C., Kuo, F., Wang, Y., Hsu, W., Yu, F., Wu, D. (2018). Fecal microbiota transplantation: Review and update. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118(1): 523-531.
- Zahn, G., Amend, A. S. (2017). Foliar microbiome transplants confer disease resistance in a critically- endangered plant. *Peer J*, 5: 1–16.
- Zalar, P., Gunde-cimerman, N. (2016). The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. *Public Library of Science*, 11(2): 1–29.
- Zeng, W., Zhang, B., Chen, G. (2019). Efficient Production of Polymalic Acid by a Novel Isolated *Aureobasidium pullulans* Using Metabolic Intermediates and Inhibitors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(2): 612–627.
- Zhang, Y., Li, X., Shen, F., Xu, H., Li, Y., Con-, B. (2018). Characterization of *Botrytis cinerea* Isolates from Grape Vineyards in China. *Plant Disease*, 102(1): 40–48.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., Xu, J. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BioMed Central Genomics*, 14(274): 1-15.