

## **Caracterização da população microbiana endo- e epifítica em azeitonas de cultivares Transmontanas**

**Rui Miguel Ferreira Gomes Pereira**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária para obtenção do Grau de Mestre  
em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

Prof. Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista  
Prof. Doutor José Alberto Pereira

**Bragança  
2014**



*Aos meus Heróis*  
*À Elza*



## **Agradecimentos**

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Paula Baptista por todo o auxílio prestado e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho, pela sua disponibilidade, por toda a motivação, conselhos e todo o apoio fornecidos. Pela sua paciência.

Agradecer também ao meu Co-orientador Professor Doutor José Alberto Pereira, por toda a disponibilidade e por todos os conhecimentos e conselhos dados e por toda a ajuda disponibilizada.

À Teresa por todo o apoio, ajuda e incentivo, em especial, pela ajuda na parte da identificação molecular, e por todos os conhecimentos transmitidos. Agradeço também à Fátima, pela constante motivação e apoio.

Ao Nuno e ao Ricardo por toda a ajuda e auxílio prestado no laboratório, e por todas as explicações e esclarecimentos dados.

Aos Diogos por todo o apoio, ajuda, incentivo e boa disposição.

Ao Pedro, à Cynthia, ao Afonso e ao Tiago por todo o carinho, amizade e boa disposição transmitida e por todos os momentos vividos ao longo destes anos.

À Elza, por ser quem é! Por toda a ajuda e auxílio nos momentos mais difíceis, pela sua constante ajuda, paciência, compreensão, incentivo e pelo apoio demonstrado no percurso deste trabalho. Pela sua paciência para comigo e por todos os seus conhecimentos. Pelo seu carinho, afeto de todos estes anos. Uma vez que sem ela nada disto seria possível.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família. Em especial aos meus heróis que tudo fizeram para que chegasse até aqui e concluísse mais uma etapa do meu percurso académico, pelo seu constante apoio e amor. Obrigado Pai e Mãe!



Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto “Proteção da oliveira em modo de produção sustentável num cenário de alterações climáticas globais: ligação entre infraestruturas ecológicas e funções do ecossistema” (EXCL/AGR-PRO/0591/2012).





## Índice

Resumo .....	xi
Abstract.....	xii
Capítulo 1.....	1
Enquadramento e objetivos.....	3
Capítulo 2_ Introdução .....	5
2.1. A cultura do olival em Portugal e em Trás-os-Montes .....	7
2.2. A Filosfera.....	8
2.2.1. Microrganismos epifíticos .....	10
2.2.2. Microrganismos endofíticos.....	12
2.3. Microflora associada à azeitona em fresco e importância do seu estudo.....	15
2.4. Bioprospeção de microrganismos epifíticos e endofíticos.....	17
2.4.1. Isolamento e obtenção de culturas puras .....	18
2.4.2. Identificação.....	19
Bibliografia .....	23
Capítulo 3.....	33
Characterization of olive fruit epiphyte and endophyte microflora and its potential in the development of new olive-derived products .....	33
Abstract .....	37
Introduction.....	38
Material and methods.....	39
Sampling .....	39
Isolation of epiphytic and endophytic microorganisms from olives.....	40
Identification of microbial isolates .....	41
Data analysis .....	42
Results and Discussion .....	44
General overview of fungal and bacterial community of olives.....	45
Comparison of endophytic and epiphytic communities.....	51
Comparison of microbial communities between olive tree cultivars.....	54
Conclusion .....	61
References.....	63
Supporting information.....	71
Capítulo 4.....	73
Conclusão.....	75



## Resumo

A parte área das plantas (filosfera) é colonizada por uma comunidade microbiana diversa, que pode crescer tanto epifiticamente na superfície dos órgãos como endofiticamente no interior dos tecidos. Estes microrganismos contribuem para uma melhoria do crescimento e da saúde das plantas. A maioria dos trabalhos relacionados com a microbiologia da filosfera foi realizada nas folhas, sendo os frutos muito pouco estudados. Neste trabalho foi avaliada, pela primeira vez, a diversidade da comunidade microbiana endofítica e epifítica associada a azeitonas de três cultivares Portuguesas (Madural, Cobrançosa e Verdeal Transmontana). A influência da cultivar na comunidade microbiana presente no fruto foi igualmente avaliada. As bactérias e os fungos foram isolados de azeitonas em meio de cultura batata dextrose agar e agar padrão para contagem, respectivamente, e os isolados obtidos foram identificados por sequenciação da região 16S (para bactérias) e ITS (para fungos) dos genes RNAr. Um total de 270 isolados (122 bactérias, 151 fungos filamentosos) pertencentes a 41 taxa (6 bactérias, 35 fungos filamentosos) foram isolados a partir das azeitonas das três cultivares. No geral, a comunidade epifítica foi mais diversa (35 taxa) e abundante (227 isolados) face à comunidade endofítica (13 taxa, 43 isolados). Em ambas as comunidades a espécie mais abundante foi a bactéria sp. 6, cuja identificação não foi possível de efectuar, seguida pelos fungos *Davidiella tassiana* e *Penicillium expansum* ao nível dos epifíticos, ou por *Pyronema domesticum* e *Fusarium lateritium* ao nível dos endofíticos. As duas comunidades apresentaram uma reduzida similaridade ao nível da composição de espécies, com um índice de Sørensen de 0,260. A cultivar demonstrou influenciar a estrutura da comunidade microbiana. A diversidade e a riqueza de fungos endófitos foram superiores nas azeitonas das cvs. Verdeal Transmontana (5 taxa, 12 isolados) e Madural (5 taxa, 10 isolados); enquanto que nos endófitos foi superior nas azeitonas das cvs. Cobrançosa (16 taxa, 32,68 ufc/cm<sup>2</sup>) e Madural (13 taxa, 32,88 ufc/cm<sup>2</sup>). A frequência de colonização pelos fungos endofíticos foi superior nas azeitonas das cvs. Verdeal Transmontana e Madural (17% cada), e a colonização por bactérias foi superior nas azeitonas das cvs. Cobrançosa (10%) e Madural (8%). Os resultados indicam que tanto as propriedades do habitat (endófito vs. epífita) como a cultivar são importantes na determinação da estrutura e da diversidade da comunidade bacteriana e fúngica associada às azeitonas.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L., bactéria, fungo, Madural, Verdeal Transmontana, Cobrançosa.

## Abstract

The above-ground parts of plants (phyllosphere) harbor a diverse microbial community, both as epiphytes on the plant surface and within plant tissues as endophytes, that play a crucial role for plant health and growth. Much of the work on phyllosphere microbiology has been focused on leaves, whereas fruits have been rarely studied. In this work the diversity of endophytic and epiphytic microbial community associated with olive fruit of three Portuguese cultivars (Madural, Cobrançosa and Verdeal Transmontana) was assessed for the first time. The effect of plant cultivar on microbial community inhabiting olive fruit was also evaluated. Bacteria and fungi were isolated from fresh olive fruits in plate count agar and in potato dextrose agar medium, respectively, and the isolates obtained were identified by sequencing the 16S (for bacteria) and the ITS region (for fungi) of rRNA genes. A total of 270 isolates (122 bacteria, 151 filamentous fungi) belonging to 41 taxa (6 bacteria, 35 filamentous fungi) were isolated from olives of the three cultivars. Overall, the epiphytic community was most diverse (35 taxa) and rich (227 isolates) than endophytic community (13 taxa, 43 isolates). In both communities the specie most abundant was the unidentified bacteria sp. 6, followed by *Davidiella tassiana* and *Penicillium expansum* within epiphytes, or by *Pyronema domesticum* and *Fusarium lateritium* within endophytes. Both communities showed low similarity on species composition, with a Sørensen index of 0.26. Olive tree cultivar was found to influence microbial community structure. The diversity and richness of fungal endophytes was higher on olives of cvs. Verdeal Transmontana (5 taxa, 12 isolates) and Madural (5 taxa, 10 isolates); whereas of epiphytes was on olives of cvs. Cobrançosa (16 taxa, 32.68 cfu/cm<sup>2</sup>) and Madural (13 taxa, 32.88 cfu/cm<sup>2</sup>). The frequency of fungal colonization was highest in olives of cv. Verdeal Transmontana and Madural (17% each) whereas of bacteria was in olives of cv. Cobrançosa (10%) and Madural (8%). The results show that both the habitat (endophyte vs. epiphyte) properties and the plant cultivar are important in determining the structure and diversity of the bacterial and fungal community associated to olive fruit.

Key-words: *Olea europaea* L., bacteria, fungi, Madural, Verdeal Transmontana, Cobrançosa.

# Capítulo 1

## Enquadramento e Objetivos



## **Enquadramento e objetivos**

A filosfera corresponde à totalidade da parte aérea das plantas vasculares. Este habitat caracteriza-se por apresentar uma enorme diversidade e riqueza de microrganismos que crescem quer na superfície (epifíticos) quer no interior (endofíticos) dos tecidos dos diferentes órgãos da planta. Trata-se de uma comunidade muito complexa, cuja composição é fortemente influenciada por uma multiplicidade de fatores físicos e químicos relacionados com a planta hospedeira, assim como por fatores climáticos, como sejam a temperatura, radiação ultravioleta, entre outros. As interações entre as diversas espécies de microrganismos e entre estes e a planta hospedeira também revelaram exercer grande influência na composição da comunidade microbiana presente na filosfera.

Recentemente, esta população microbiana tem despertado a atenção da comunidade científica com o intuito da sua exploração a nível agrícola e alimentar. Na agricultura, existe um particular interesse na deteção e seleção de microrganismos da filosfera que promovam o crescimento e proteção de plantas contra agentes de stresse bióticos (pragas e doenças) e abióticos. A nível alimentar, os microrganismos da filosfera têm sido explorados ao nível da qualidade e segurança das hortofrutícolas consumidas em fresco, devido ao seu papel no controlo de microrganismos patogénicos para o homem em frutas e legumes consumidas em cru. Contudo, a maioria destes estudos tem-se centrado na comunidade bacteriana presente nas folhas. Outros grupos de microrganismos bem como outros órgãos das plantas têm sido menos estudados.

Os produtos derivados do olival, em especial o azeite e a azeitona de mesa, têm um peso importante na economia nacional, incluindo em Trás-os-Montes. A comunidade microbiana epifítica e endofítica associada às azeitonas em fresco e o seu potencial uso a nível agrícola e alimentar foi pouco estudada. A exploração biotecnológica de microrganismos que colonizam naturalmente as azeitonas poderá ser uma estratégia interessante para a obtenção de produtos diferenciados do olival. Estes microrganismos podem, por exemplo, ser explorados no sentido de contribuírem para uma melhoria do aroma, sabor e qualidade dos produtos do olival ou ainda para o desenvolvimento de produtos funcionais (probióticos). Contudo, esta

estratégia só será possível após o conhecimento da flora microbiana autóctone presente nas cultivares. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivos:

- 1 - Isolar os microrganismos epifíticos e endofíticos de azeitonas de três cultivares de oliveira de grande importância económica na região de Trás-os-Montes, nomeadamente Madural, Verdeal Transmontana e Cobrançosa;
- 2 - Caracterizar os isolados morfológicamente e molecularmente através de sequenciação da região ITS (para fungos) e 16S (para bactérias) do DNA ribossomal;
- 3 - Explorar as potencialidades dos isolados obtidos, com base nas suas propriedades descritas na bibliografia, para a obtenção de produtos diferenciados do olival, em especial azeite, azeitonas de mesa e azeitonas descaroçadas (alcaparras).

A criação da coleção de isolados autóctones será bastante útil para trabalhos futuros que visem a sua seleção com vista à melhoria das propriedades sensoriais, garantia de segurança alimentar e desenvolvimento de produtos do olival, que providenciem efeitos benéficos para a saúde humana (por exemplo azeitonas probióticas). A nível agrícola, a coleção poderá ser útil para a seleção de agentes de luta biológica contra as principais doenças que afectam a cultura da oliveira.

A dissertação foi elaborada no formato de artigo científico (capítulo 3), ao qual se incluiu um capítulo inicial introdutório (capítulo 2) e, no fim, um capítulo de conclusões gerais (capítulo 4). Na introdução será feita referência à importância do olival a nível nacional e à comunidade microbiana epifítica e endofítica (definição, fatores que influenciam a sua composição e sua importância a nível agrícola e alimentar). É ainda mencionado alguns estudos que reportam a microflora associada a azeitonas frescas e da importância do seu estudo, bem como ao procedimento a seguir para o isolamento e identificação destes microrganismos.

# Capítulo 2

**Introdução**



## 2.1. A cultura do olival em Portugal e em Trás-os-Montes

O olival é uma cultura que, a nível nacional, apresenta uma grande importância económica, social e paisagística. Portugal ocupa a décima posição no ranking mundial e a quarta posição a nível da União Europeia (FAOSTAT, 2014) com uma produção de azeitonas (para azeite e de mesa) na ordem das 416 599 toneladas no ano 2012 (Estatísticas Agrícolas, 2012). No mesmo ano, as exportações de azeitona de mesa, em Portugal, rondaram as 14 280 toneladas e as de azeite 96 077 toneladas, gerando um total de 268 787 milhões de euros (Estatísticas Agrícolas, 2012). A nível social, a cultura da oliveira para além de contribuir para a coesão social e territorial, também possui um papel importante na fixação das populações por constituir uma fonte de emprego. Este aspeto é extremamente importante para as regiões do interior, onde se situa a maioria da área olivícola, por serem mais desfavorecidas, com uma população mais envelhecida e é em menor número. Os olivais são uma marca da paisagem nacional apresentando, deste modo, importância paisagística. A beleza destas paisagens tem estimulado nos últimos anos o setor do turismo, o que poderá ser um complemento muito importante ao rendimento da empresa agrícola.

Trás-os-Montes é a segunda maior região produtora de azeite e azeitona de mesa, contribuindo com 25% e 27%, respetivamente, para a produção nacional (COI, 2012). Nesta região existem cerca de 39 mil explorações agrícolas com olival, ocupando uma área total de cerca de 72 mil hectares (MADRP, 2007). A maioria destas explorações apresenta uma área média de olival por exploração de 2,43 hectares (MADRP, 2007). As cultivares predominantes nesta região são a Cobrançosa, Verdeal Transmontana, Madural, Negrinha e Santulhana (Alves, 2007). Os produtos do olival (azeite e azeitona de mesa) produzidos nesta região caracterizam-se por possuírem características únicas o que se deve, em grande parte, às condições climáticas, às características especiais das cultivares e ao saber fazer das populações rurais. Nesta região produz-se azeite e azeitona de mesa com direito a Denominação de Origem Protegida (DOP): o “Azeite de Trás-os-Montes” e a “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”. Ambos os produtos possuem uma grande importância económica para a região.

## 2.2. A Filosfera

A filosfera, em analogia com a rizosfera, corresponde à totalidade da parte aérea das plantas vasculares (Newton et al., 2010). É dominada pelas folhas, representando as flores, os frutos e os ramos / troncos apenas uma pequena fração. Trata-se de um habitat com uma enorme diversidade de microrganismos incluindo, na sua maioria, bactérias, mas também leveduras, fungos, oomycetes e algas (Lindow e Brandl, 2003). Mesmo num ambiente hostil, como a superfície foliar, exposta a frequentes variações de temperatura, humidade, radiação ultravioleta, e com baixa disponibilidade de nutrientes, é possível encontrar bactérias a uma densidade  $10^6 - 10^7$  células/cm<sup>2</sup> de folha (Lindow e Brandl, 2003). Tendo por base este valor e considerando que a área total da superfície das folhas a nível mundial é de  $6,4 \times 10^8$  km<sup>2</sup> (Woodward e Lomas, 2004), estimou-se que a população bacteriana nesta superfície poderá ser superior a  $10^{26}$  células (Vorholt, 2012).

Os microrganismos na filosfera podem colonizar a superfície (colonização epifítica) ou os tecidos internos (colonização endofítica) das plantas (Lindow e Brandl, 2003; Stapleton e Simoons, 2006). Trata-se de uma comunidade muito complexa, cuja composição pode ser influenciada por uma multiplicidade de fatores relacionados com o clima, em especial com a temperatura, humidade e radiação ultravioleta (Beattie, 2011; Finkel et al., 2011; Lindow e Brandl, 2003), e com a planta hospedeira (Vorholt, 2012). Neste âmbito destaca-se o efeito do genótipo e fenótipo, bem como da espécie da planta hospedeira (Ding et al., 2013; Kinkel et al., 2000;), da cultivar (Hunter et al., 2010), das propriedades físicas (e.g. morfologia da folha) e composição química (e.g. níveis de ceras, nutrientes minerais, compostos fenólicos, hidratos de carbono, entre outros) da planta hospedeira (Hunter et al., 2010) e da idade do órgão amostrado (Ercolani, 1991). Vários estudos têm igualmente demonstrado que a diversidade e abundância da comunidade microbiana presente na filosfera é variável de acordo com a data de amostragem, localização geográfica (Ding et al., 2013) e estação do ano (Peñuelas et al., 2012).

A colonização da filosfera por estes microrganismos resulta numa melhoria para o crescimento e resistência/tolerância a stresses bióticos e abióticos da planta hospedeira (Figura 1) (Lindow e Brandl, 2003; Muller e Ruppel, 2014) podendo ainda

desempenhar uma multiplicidade de funções ecológicas, por alguns destes microrganismos se encontrarem envolvidos na manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos e noutros processos que determinam a sustentabilidade do ecossistema (Muller e Ruppel, 2014). Adicionalmente, a composição da comunidade microbiana presente na filosfera terá igualmente importância ao nível da qualidade e segurança das hortofrutícolas consumidas em fresco, em especial as relacionadas com os perigos microbiológicos. As interações que se estabelecem ao nível dos microrganismos presentes na filosfera têm repercussões ao nível da sobrevivência e do crescimento de microrganismos patogénicos humanos, o que terá implicações na qualidade e segurança das frutas e legumes consumidas em cru (Whipps et al., 2008, Berger et al., 2010).



**Figura 1** – Efeito da colonização da filosfera pelos microrganismos endófitos e epifíticos no aumento do crescimento e resistência da planta hospedeira a stresses bióticos e abióticos (adaptado de Partida-Martínez e Heil, 2011).

Apesar de já terem sido realizados alguns estudos sobre os microrganismos presentes na filosfera (Lindow e Brandl, 2003; Müller e Ruppel, 2014; Vorholt, 2012), ainda não se conhece bem a sua ecologia e o papel que desempenham, em

especial, os efeitos benéficos para a planta hospedeira (Knief et al., 2011). Este conhecimento irá certamente facilitar a aplicação biotecnológica destes microrganismos como agentes de luta biológica e na promoção do crescimento da planta hospedeira, assim como no controlo de microrganismos patogénicos para o homem em frutas e legumes consumidas em cru (Müller e Ruppel, 2014). A maioria dos estudos realizados ao nível da comunidade microbiana associada à filosfera tem-se centrado na avaliação da diversidade de microrganismos epifíticos e endofíticos presentes nas folhas, e apenas um reduzido número se dedicou às outras partes aéreas das plantas vasculares como sejam os frutos, flores e ramos (Lindow e Brandl, 2003; Müller e Ruppel, 2014; Vorholt, 2012). Similarmente, as bactérias têm sido o grupo de microrganismos mais estudado ao nível da filosfera pela simples razão de serem apontadas como sendo os mais abundantes (Lindow e Brandl, 2003). Pelo contrário, os fungos e as leveduras têm sido menos estudados não significando, contudo, terem um papel menos relevante face às bactérias.

### **2.2.1. Microrganismos epifíticos**

A definição de microrganismos epifíticos não é consensual (Newton et al., 2010). Alguns autores consideram que a população epifítica microbiana corresponde a todos os microrganismos que podem ser removidos da superfície dos órgãos vegetais aéreos através de lavagens (Hirano e Upper, 1983) ou eliminados quer pela exposição à radiação ultravioleta quer através da desinfeção química (Newton et al., 2010). Contudo, outros autores consideram que estes microrganismos, por se encontrarem melhor adaptados ao ambiente epifítico, não são removidos facilmente por lavagem (Romantschuk, 1992) pois a sua adesão representa uma vantagem selectiva nesse ambiente. A definição que reúne mais consenso considera-os como sendo os microrganismos que possuem capacidade de viver e de se multiplicar continuamente na superfície dos órgãos da planta (Beattie e Lindow, 1999; Lindow e Brandl, 2003).

Os vários estudos efectuados até à data têm evidenciado uma grande abundância e diversidade de microrganismos epifíticos na parte aérea de diversas espécies vegetais (Müller e Ruppel, 2014). A parte aérea das plantas, devido à sua exposição directa com a atmosfera e à vegetação circundante, é um sistema aberto o que aumenta a probabilidade de ocorrência de imigração e de emigração de

microrganismos da filosfera (Lindow e Brandl, 2003). A disseminação destes microrganismos é promovida essencialmente pela chuva, vento, e insetos (Beattie e Lindow, 1999; Lindow e Brandl, 2003). A fixação, o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, quando atingem a superfície dos tecidos das plantas, depende de uma multiplicidade de fatores físicos e químicos. Ao nível das propriedades físicas destacam-se a hidrofobia da superfície foliar e a complexa topografia apresentada pela maioria das folhas que, em geral, impedem a fixação dos microrganismos (Lindow e Brandl, 2003). Ao nível químico, é a disponibilidade de nutrientes, o principal fator limitativo do crescimento e sobrevivência dos microrganismos epifíticos (Hirano e Upper, 2000). Os açúcares, em especial a glucose, frutose e sacarose, constituem a principal fonte de carbono dos microrganismos. Estes açúcares podem ser excretados a partir dos tecidos das plantas sob a forma de exsudados ou então podem ser depositados na superfície das folhas pela chuva, vento ou insetos (Mercier e Lindow, 2000). Geralmente, os nutrientes encontram-se presentes em pequenas quantidades (Mercier e Lindow, 2000) e distribuídos irregularmente pela superfície das folhas (Monier e Lindow, 2004). Esta irregularidade permite a formação de microcolónias ou agregados microbianos junto a estas áreas ricas em nutrientes (Lindow e Brandl, 2003, Monier e Lindow, 2003), que frequentemente se encontram embebidos numa matriz de exopolissacáridos (Baldotto e Olivares, 2008). Este facto, associado às diferenças de propriedades físicas, tem como consequência a distribuição irregular dos microrganismos epifíticos ao longo da superfície dos órgãos de uma mesma planta. Por exemplo, verificou-se que a maioria das bactérias epifíticas presente na superfície das folhas se localizava preferencialmente na base dos tricomas, junto aos estomas, nas junções entre as células da parede celular e nas estrias das nervuras (Newton et al., 2010). Verificou-se igualmente uma maior abundância de bactérias na superfície abaxial (página inferior) das folhas face à superfície adaxial (página superior) (Beattie e Lindow, 1995). Este facto poderá dever-se ao maior número de tricomas e de estomas presentes na página inferior das folhas, assim como à menor espessura da camada cuticular desta superfície que potencialmente permite uma maior excreção de nutrientes, e à sua reduzida exposição à radiação ultravioleta (Beattie e Lindow, 1995). Similarmente foi observado uma maior abundância de bactérias epifíticas junto aos tricomas e na ausência de ceras epicuticulares (Baldotto e Olivares, 2008).

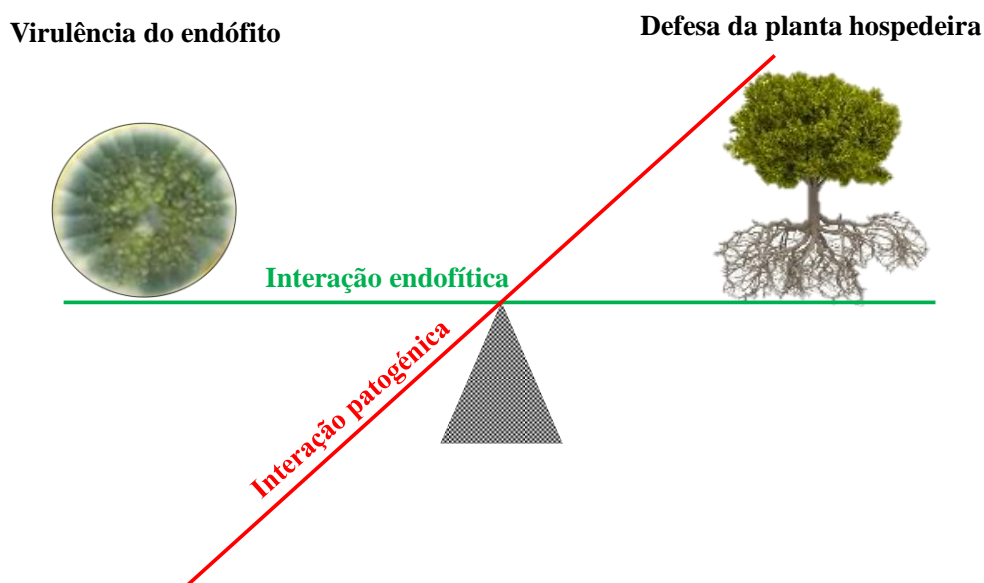
A superfície dos órgãos das plantas é um ambiente muito hostil para o desenvolvimento de microrganismos, por se encontrar sujeita a rápidas flutuações na disponibilidade de água e nutrientes, a valores de temperatura e intensidade de radiação ultravioleta, ionizante e não ionizante (Vorholt, 2012). Assim sendo, a sobrevivência dos microrganismos epifíticos neste ambiente hostil é dependente da sua capacidade em se adaptar a estas rápidas mudanças e ao reduzido teor em nutrientes. Uma das adaptações à exposição da radiação ultravioleta consistiu na aquisição de pigmentação por parte de algumas bactérias epifíticas, de forma a se protegerem contra esta radiação (Fokkema e Schippers, 1986, Stout, 1960). Outro exemplo, são as bactérias metilotróficas facultativas pigmentadas de rosa (*Pink-Pigmented Facultatively Methylophilic Bacteria* - PPFMs) que se caracterizam pela capacidade de crescer utilizando apenas como única fonte de energia compostos com apenas um carbono, como o metanol e formaldeído, emitido pelas plantas (Abanda-Nkpwatt et al., 2006). Adicionalmente, pensa-se que a coloração rosa adquirida por estas bactérias seja um mecanismo de proteção contra a radiação solar durante o crescimento epifítico.

Os microrganismos epifíticos presentes na superfície dos órgãos das plantas podem ter efeitos benéficos, neutros ou deletérios para a planta. Os efeitos benéficos traduzem-se pelo aumento do crescimento das plantas. Os microrganismos epifíticos podem promover o crescimento das plantas directamente pela produção de hormonas vegetais, tais como citoquininas (Ivanova et al., 2000) e auxinas (Omer et al., 2004), e/ou indirectamente pela proteção das plantas contra agentes fitopatogénicos (Wang et al., 2009). Neste último caso, os mecanismos de ação adoptados pelos microrganismos envolve a produção de compostos antimicrobianos (antibiose), e a competição por nutrientes e espaço (Berg, 2009).

### **2.2.2. Microrganismos endofíticos**

Os microrganismos endofíticos caracterizam-se por colonizarem os tecidos internos das plantas, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem aparentemente causarem quaisquer danos no hospedeiro (Hyde e Soyong, 2008). O tipo de interação que se estabelece entre endófito-planta é geralmente mutualista, mas também pode tornar-se parasita originando doença na planta hospedeira (Schulz e

Boyle, 2005). O resultado desta interação é determinado pelo estabelecimento de um equilíbrio entre a virulência do microrganismo e a defesa da planta hospedeira (Figura 2) (Schulz e Boyle, 2005). No caso de se atingir este equilíbrio, a interação resultante é do tipo mutualista com vantagens para ambos os intervenientes. O endófito, pela produção ou indução da produção de metabolitos primários e secundários, confere vantagens à planta hospedeira ao aumentar o seu crescimento, reprodução e resistência/tolerância a stresses bióticos (insetos, herbívoros, fitopatogénicos) e abióticos (stress hídrico, salinidade, metais pesados, entre outros) (Partida-Martínez e Heil, 2011; Soliman et al., 2013;). Por sua vez, a planta hospedeira serve de refúgio ao endófito protegendo-o, fornece-lhe os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e possui ainda um papel importante na sua transmissão (Soliman et al., 2013). Se por qualquer motivo, o equilíbrio for alterado, quer pela diminuição da defesa da planta ou aumento da virulência do endófito, a interação passa a ser parasita, com efeitos deletérios para a planta hospedeira.



**Figura 2** - Hipótese explicativa para o estabelecimento de relações mutualistas ou parasitas entre fungo endofítico - planta hospedeira. A ocorrência de equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e a virulência do fungo resulta numa interação mutualista. Na ausência de equilíbrio a interação é parasita ocorrendo doença.

Nos últimos anos, estes microrganismos endófitos têm sido alvo de estudos com vista à identificação de novos compostos bioativos naturais que possam ser utilizados não só na indústria farmacêutica (Liang et al., 2012; Qadri et al., 2013), mas também alimentar e agrícola (Porrás-Alfaro e Bayman, 2011). Ao nível

farmacêutico foi já identificado uma multiplicidade de compostos, pertencentes a várias classes químicas, que apresentaram atividades biológicas muito diversas incluindo, por exemplo, antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, imunossupressora, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica (Aly et al., 2010, 2011; Guo et al., 2000; Ondeyka et al., 1997 ; Shweta et al., 2010 ; Wang et al., 2012; Zhang et al., 1999, 2006 ). Os fungos endófitos possuem ainda a capacidade de produzirem uma grande variedade de enzimas extracelulares, incluindo proteases, lípases, celulasas, pectinases, xilanases, amílases, entre outras (Bhagobaty e Joshi, 2012; Robl et al., 2013; Sunitha et al., 2013), com potencial aplicação em diferentes indústrias incluindo a alimentar. A produção enzimática por fungos endofíticos é variável, estando relacionada com a especificidade entre a planta hospedeira e o fungo (Sunitha et al., 2013). A maioria destas enzimas está envolvida no processo de colonização da planta hospedeira pelo endófito ou no antagonismo exercido pelo endófito contra fitopatogénicos (Cao et al., 2009). A nível agrícola destaca-se o uso destes microrganismos, em especial dos fungos endófitos, como agentes de luta biológica contra pragas e doenças. Alguns fungos entomopatogénicos, como a *Beauveria bassiana*, podem ser endofíticos e a sua capacidade na proteção da planta hospedeira contra o ataque de insetos fitófagos foi já observada (Posada e Veja, 2006; Tefera e Vidal, 2009). Os mecanismos de ação destes endófitos baseiam-se i) na produção de toxinas (e.g. alcalóides, neurotoxinas) ou de outros compostos que podem diminuir a atratividade da planta hospedeira aos insetos e herbívoros; ii) no aumento da susceptibilidade do inseto a doenças ou na inibição do seu desenvolvimento, uma vez que alguns dos endófitos são também entomopatogénicos; iii) na indução de genes relacionados com a resistência da planta hospedeira; iv) e no aumento da diversidade genética e bioquímica da planta hospedeira (Vega et al., 2009). Foram também já descritos casos de sucesso da aplicação de fungos endofíticos na luta biológica contra doenças fúngicas que afetam culturas importantes como o cacauero (Mejía et al., 2008) e a bananeira (Mendoza e Sikora, 2009). O seu modo de ação na luta biológica é variado podendo atuar diretamente sobre o fitopatogénio através de diversos mecanismos antagonistas, tais como micoparasitismo, antibiose e competição por nutrientes; ou indiretamente pela indução de resistência na planta hospedeira (Eyles et al., 2010; Gao et al., 2010). É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia e simultaneamente durante a interação antagónica (Ownley et al., 2010).

### 2.3. Microflora associada à azeitona em fresco e importância do seu estudo

Como referido anteriormente estudos conducentes à avaliação da população microbiana associada aos frutos são escassos quando comparado com as folhas (Lindow e Brandl, 2003). Ao nível da azeitona, os vários trabalhos realizados neste âmbito visam apenas estudar vários aspetos microbiológicos associados ao processo de fermentação de azeitonas de mesa (Heperkan, 2013). Estudos que avaliem a comunidade microbiana associada a azeitonas em fresco são muito escassos. Em azeitonas da cultivar grega Amfissis armazenadas em condições industriais durante 10-12 dias após a colheita foi identificada a presença de fungos pertencentes ao género *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Verticillium* e a espécie *Rhizopus nigricans*, de leveduras do género *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces* e *Wickerhamiella*, e bactérias gram-positiva do género *Actinomyces*, *Caseobacter*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Streptococcus*, e gram-negativa do género *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Franciscella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Xanthomonas* (Fakas et al., 2010). Ao nível de cultivares portuguesas apenas Borges (2013) recentemente identificou a flora microbiana indígena presente na polpa da azeitona da cultivar Negrinha de Freixo antes de ser submetida ao processo fermentativo. Verificou que as leveduras foram a população predominante, apresentando contagens de 3,59 log UFC/g, seguindo-se os microrganismos mesófilos aeróbios (3,13 log UFC/g), bactérias lácticas (2,60 log UFC/g) e fungos filamentosos (1,06 log UFC/g). A identificação molecular das leveduras obtidas indicou a presença de sete espécies, com uma abundância na seguinte ordem decrescente: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula graminis*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Debaryomyces hansenii* e *Candida norvegica* (Borges, 2013; Pereira et al., 2015).

Nas últimas décadas tem-se assistido a uma variação dos hábitos alimentares, devido às transformações económicas, socioculturais e demográficas, que tem levado os consumidores a preferirem alimentos diferenciados. O azeite e a azeitona de mesa são dois produtos alimentares com enorme importância na dieta mediterrânica, muito apreciados pelo consumidor devido às suas propriedades organolépticas e benéficas

para a saúde. Nos últimos anos tem-se verificado que as estratégias de comercialização destes dois produtos do olival direcionam-se para o desenvolvimento de produtos inovadores podendo destacar-se, por exemplo, azeites com aroma e sabor agradável e diferenciador (Sánchez-Ortiz et al., 2012), bem como azeitonas de mesa probióticas (Rodríguez-Gómez et al., 2014).

O aroma e sabor (*flavour*) único do azeite são atribuídos aos compostos voláteis que se desenvolvem durante e após a extração do azeite (Kalua et al., 2007). Estes compostos são maioritariamente produzidos pela oxidação dos ácidos gordos polinsaturados. Durante a extração, os compostos voláteis são formados a partir da ação de enzimas endógenas da azeitona, através da via da lipoxigenase, que são libertadas durante a moenda (Kalua et al., 2007). A via da lipoxigenase envolve a reação de uma série de enzimas que oxidam (lipoxigenase) e clivam (hidroperóxido-liase) os ácidos gordos polinsaturados resultando na produção de aldeídos responsáveis pela atribuição do *flavour* ao produto final (Kalua et al., 2007). Alguns microrganismos, nomeadamente fungos, possuem também a capacidade de produzir lipoxigenases e hidroperóxido-liase. A atividade da lipoxigenase foi já identificada em várias espécies de fungos, nomeadamente *Geotrichum candidum* (Perraud et al., 1999), *Fusarium proliferatum* (Husson et al., 1998), *Penicillium camemberti* (Husson et al., 2002; Perraud e Kermasha, 2000), *Penicillium roqueforti* (Perraud e Kermasha, 2000), *Thermomyces lanuginosus* (Duo-Chuan et al., 2001) e algumas espécies pertencentes ao género *Mortierella* (Filippovich et al., 2001). A atividade de hidroperóxido-liase foi igualmente verificada nos fungos *P. camemberti* e *P. roqueforti* (Kermasha et al., 2002). A riqueza de espécies de microrganismos presente na azeitona demonstrada em estudos anteriores (Fakas et al., 2010; Borges, 2013) associada ao seu potencial em sintetizar enzimas da via da lipoxigenase sugere que estes microrganismos possam ter um papel importante na determinação do aroma e sabor do azeite. De facto, algumas espécies do género *Penicillium* e *Fusarium* presentes na microflora da azeitona, já demonstraram estar envolvidas na biogénese de compostos voláteis em azeite (Fakas et al., 2010). Assim sendo, a identificação de microrganismos que participem na produção de compostos voláteis poderá ter um grande impacto na produção de azeite. A utilização controlada destes microrganismos ou das enzimas por eles sintetizadas na produção de azeite poderá contribuir para melhorar a sua qualidade, ao nível do aroma e sabor. Estudos neste âmbito são muito

escassos mas de extrema importância para a obtenção de produtos diferenciados e de superior qualidade.

Nos últimos anos a azeitona de mesa suplementada com culturas microbianas probióticas assumiram um papel relevante (Bautista-Gallego et al., 2013; Rodríguez-Gómez et al., 2014). As estirpes probióticas usadas para a incorporação em alimentos devem suportar as aplicações industriais, as condições do meio ambiente e serem capazes de crescer/sobreviver em níveis adequados no produto durante o seu tempo de prateleira (Donkor et al., 2007). Assim sendo, com a atual tendência na diversificação de produtos de azeitona de mesa é aconselhável que os microrganismos probióticos a aplicar tenham tido origem da superfície do fruto e/ou da sua polpa (Bautista-Gallego et al., 2013; Karasu et al., 2010). Estas estirpes apresentam maior probabilidade em crescer / sobreviver às características físico-químicas da matriz e ao seu processamento. Os microrganismos comumente utilizados como culturas probióticas em azeitonas de mesa funcionais pertencem ao grupo das bactérias lácticas e incluem-se sobretudo nos géneros *Lactobacillus*, como por exemplo *L. pentosus* (Bautista-Gallego et al., 2013; Rodríguez-Gómez et al., 2014), *L. plantarum* e *L. paraplantarum* (Bautista-Gallego et al., 2013; Peres et al., 2014). Tanto quanto se sabe estudos que visem o isolamento e a avaliação do potencial probiótico de estirpes autóctones de azeitonas de cultivares portuguesas foram só efectuadas para a cultivar Galega vulgar (Peres et al., 2014).

Tal como mencionado anteriormente, os microrganismos epifíticos e endofíticos podem promover o crescimento da planta hospedeira e protegê-la contra doenças e pragas (Omer et al., 2004; Vega et al., 2009; Wang et al., 2009). Assim sendo, a aplicação biotecnológica de microrganismos autóctones isolados da azeitona como agentes de luta biológica ou promotores de crescimento das plantas apresenta um enorme potencial a nível agrícola. Estes microrganismos por colonizarem o mesmo habitat que os agentes fitopatogénicos e por se encontrarem adaptados ao ecossistema onde vão ser aplicados, aumenta a eficiência da sua ação.

## **2.4. Bioprospeção de microrganismos epifíticos e endofíticos**

A bioprospeção de microrganismos epifíticos e endofíticos tendo em vista a sua seleção para aplicação a nível alimentar, agrícola ou farmacêutica envolve duas

etapas: isolamento e obtenção de culturas puras, seguida pela identificação dos isolados obtidos.

#### **2.4.1. Isolamento e obtenção de culturas puras**

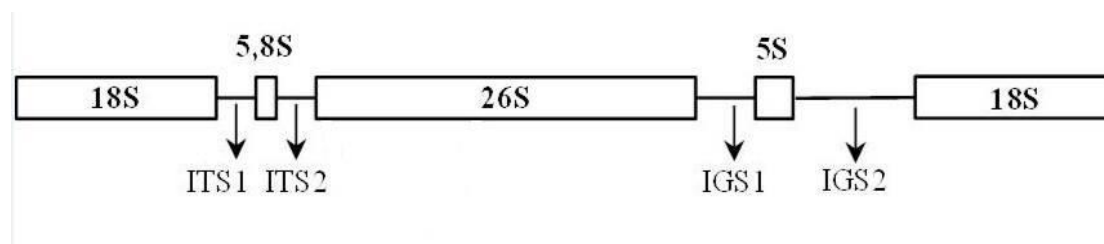
O isolamento de microrganismos epifíticos pode ser feito de variadas formas. Geralmente envolve a recolha e a suspensão dos microrganismos presentes epifiticamente nos órgãos da planta, seguida pelo seu isolamento em meio de cultura apropriado. Os microrganismos presentes epifiticamente podem ser recolhidos através da realização de esfregaços utilizando-se bolas de algodão estéreis, que posteriormente serão mergulhados em água para promover a suspensão dos microrganismos (Alvindhia e Natsuaki, 2008). Contudo, o método mais frequente envolve a submersão do órgão da planta numa solução aquosa, geralmente tampão fosfatado (Chand-Goyal e Spotts, 1996; Kuklinsky-Sobral et al., 2004). De forma a promover a dissociação dos microrganismos da superfície do órgão da planta, e conseqüentemente a sua suspensão, é muitas vezes adicionado ao tampão um detergente, por exemplo Tween 80 (Chand-Goyal e Spotts, 1996), ou esferas de vidro (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), e a incubação das amostras é efetuada num banho de ultra-sons (Chand-Goyal e Spotts, 1996) ou num agitador, por exemplo a 150 rpm (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), durante um determinado tempo normalmente inferior a 1 hora. O isolamento de microrganismos é feito, maioritariamente, com recurso à técnica da diluição em Placa de Petri (Alvindhia e Natsuaki, 2008; Chand-Goyal e Spotts, 1996; Kuklinsky-Sobral et al., 2004). Nesta técnica são preparadas sucessivas diluições da suspensão de microrganismos e, uma alíquota de cada diluição, é utilizada para inocular Placas de Petri contendo um meio de cultura. Os meios mais utilizados são a batata dextrose agar (PDA) (Alvindhia e Natsuaki, 2008), nutriente agar (Chand-Goyal e Spotts, 1996), soja triptona agar (TSA) (Kuklinsky-Sobral et al., 2004) ou o (PCA) (Allende et al., 2008; Corbo et al., 2004), suplementados ou não (Alvindhia e Natsuaki, 2008) com antibiótico, por exemplo cloranfenicol (Hallmann et al., 2006) ou antifúngico, por exemplo ciclohexamida (Chand-Goyal e Spotts, 1996) ou Imazalil (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), dependendo do grupo de microrganismos que se queira isolar (fungos ou bactérias).

No isolamento de microrganismos endofíticos, o material vegetal depois de colhido, é lavado em água corrente, fragmentado e submetido a um processo de esterilização utilizando, por exemplo, etanol e lixívia (Hallmann et al., 2006; Qadri et al., 2013). Os fragmentos desinfectados são, em seguida, incubados em caixas de Petri contendo meio de cultura apropriado por vezes, suplementado, com antibiótico ou antifúngico consoante o microrganismo que se pretende isolar (Hallmann et al., 2006). Os meios de cultura mais utilizados no isolamento dos microrganismos endofíticos e epifíticos são a Batata Dextrose Agar (PDA), no caso de fungos (Mac Faddin, 1985; Murray et al., 1995), ou PCA no caso de bactérias (Atlas, 2004; Buchbinder et al., 1951; Wehr e Frank, 2004). Posteriormente, as caixas são incubadas no escuro numa estufa a 25°C (fungos) ou 37°C (bactérias), vigiadas diariamente para avaliação do crescimento microbiano. Aquando do desenvolvimento das colónias, estas são repicadas até se obter culturas puras (Hallmann et al., 2006).

#### 2.4.2. Identificação

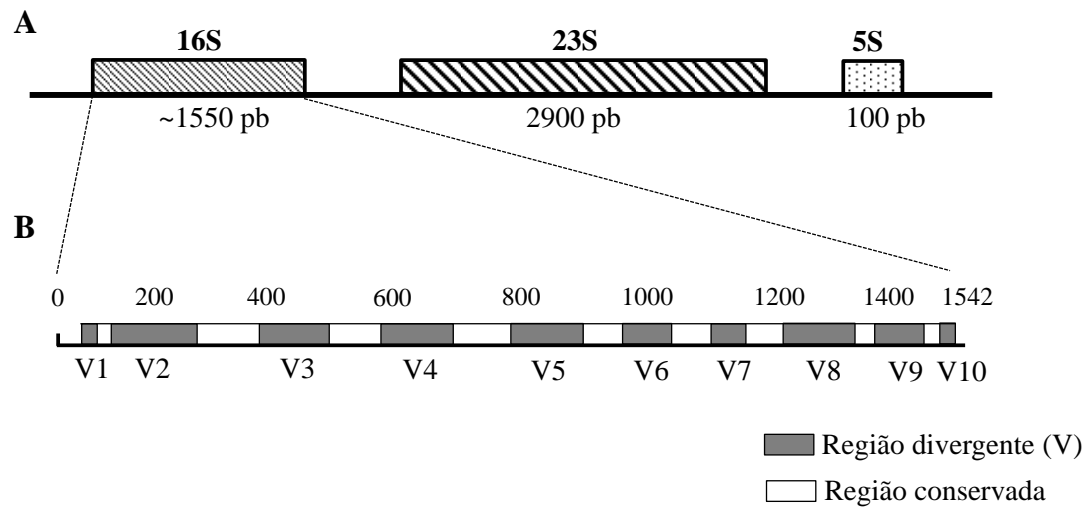
A identificação de fungos é feita com base na avaliação das características morfológicas das colónias, micélio e estruturas reprodutivas (Devie e Prabakaran, 2014), complementado com a caracterização molecular (Huang et al., 2009; Lu et al., 2012). O método molecular mais utilizado baseia-se na amplificação da região espaçadora transcrita interna (ITS, *Internal transcribed spacer*) do DNA que contém o conjunto de genes que codificam o RNA ribossómico (rRNA), seguida da sua sequenciação (Huang et al., 2009; Lu et al., 2012). O conjunto de genes de rRNA existe em múltiplas cópias e encontram-se alinhados em *tandem* (Martin e Rygielwicz, 2005). Cada unidade repetitiva do rDNA é constituída por (i) regiões codificantes conservadas, correspondentes aos três genes 18S, 5,8S e 26S; (ii) regiões não codificantes, que correspondem aos espaçadores internos transcritos (ITS) e espaçadores intergénicos não transcritos (IGS), que separam as diferentes unidades de transcrição (Figura 3) (Martin e Rygielwicz, 2005). O par de iniciadores nucleotídicos frequentemente usados para amplificar a região ITS em fungos, recorrendo à reação da polimerase em cadeia (PCR), é ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (Martin e Rygielwicz, 2005). Esta região corresponde a um fragmento do rDNA que inclui o gene 5,8S e as regiões ITS1 e

ITS2 (Huang et al., 2009; Lu et al., 2012), e foi recentemente aceite como a região “barcoding” (código de barras do DNA) de fungos (Schoch et al., 2012). As diferenças na região ITS são detetadas normalmente por sequenciação dos produtos amplificados, utilizando neste processo o mesmo par de iniciadores nucleotídicos usados na amplificação.



**Figura 3** - Representação esquemática da região de rDNA, que contém as unidades repetitivas dos genes que codificam o RNA ribossômico nuclear. Os retângulos representam os genes com sequências conservadas, enquanto as linhas representam as regiões espaçadoras mais variáveis.

À semelhança dos fungos, o método molecular mais utilizado para a identificação de bactérias baseia-se na amplificação de um dos genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA), seguida da sua sequenciação (Araújo et al., 2002; Fisher et al., 1998; Magnani et al., 2010; Tujula et al., 2006). Esta região do DNA inclui a subunidade 5S, 16S (também chamada de pequena subunidade ribossomal) e 23S (Figura 4A). De entre estes, o gene 16S é o mais utilizado na atualidade para a identificação molecular de bactérias (Janda e Abbot, 2007). Este gene contém cerca de 1550 pares de bases e é composto por regiões conservadas e variáveis (V) (Figura 4B), sendo que estas últimas apresentam assinaturas únicas para qualquer bactéria (Xu et al., 2007). Geralmente são usados iniciadores nucleotídicos universais complementares às regiões conservadas no início do gene e na região dos 540 pb, ou alternativamente no fim do gene nos 1550 pb, para a amplificação por PCR (Cai et al., 2013). A sequenciação dos primeiros 500 pb, que inclui as zonas variáveis V1, V2 e V3 é a mais utilizada na identificação bacteriana (Chakravorty et al., 2007). Esta região permite uma identificação mais precisa que a região final do gene, que inclui as zonas variáveis V7, V8 e V9, e precisão similar à sequenciação completa do gene para identificação até ao género, mas inferior na identificação até à espécie (Cai et al., 2013).



**Figure 4** – Organização estrutural dos genes do RNA ribossomal em bactérias (A) e esquema do gene 16S rRNA com indicação das zonas variáveis e conservadas (adaptado de Cai *et al*, 2003 e Sachse e Frey, 2003).



## Bibliografia

- Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., and Schwab, W. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of Experimental Botany*. 57: 4025-4032.
- Allende, A., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Villaescusa, R., and Gil, M.I. (2008). Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 155–163.
- Alves, M. (2007). Caracterização e Estrutura Genéticas da Cultivar de Oliveira “Cobrançosa” e sua Relação com o Zambujeiro. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre na Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Alvindia, D.G., and Natsuaki, K.N. (2008). Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*. 27: 1200– 1207.
- Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J., and Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers*. 41:1–16.
- Araújo, W.L., Marcon, J., Marccheroni Jr., W., van Elsas, J.D., van Vuurde, J.W.L., and Azevedo, J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10): 4906-4914.
- Atlas, R.M. (2004). *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press.
- Baldotto, L.E.B., and Olivares, F.L. (2008). Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 918-931.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., and Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*. 50: 135–142.
- Beattie, G.A. (2011). Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annual Review Phytopathology*. 49: 533-555.

- Beattie, G.A., and Lindow, S.E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*. 89: 353–359.
- Beattie, G.A., and Lindow, S.E. (1995). The secret life of foliar bacteria pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*. 33, 145–172.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84: 11-18.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*. 12(9): 2385-2397.
- Bhagobaty, R.K., and Joshi, S.R. (2012). Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the Pristine sacred forests of Meghalaya. *India Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 33-40.
- Borges, A. (2013). Evolução da população microbiana ao longo do processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo. *Dissertação de mestrado em qualidade e segurança alimentar no Instituto Politecnico de Bragança, Escola Superior Agrária*.
- Buchbinder, L., Baris, Y, Alff, E., Reynolds, E., Dillon, E., Pessin, V., Pincus, L., and Strauss, A. (1951). *Public Health Reports*. 66(11): 327-340.
- Cai, H., Archambault, M., and Prescott, J.F. (2003). 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 15: 465-469.
- Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., Dai, Y., and Wang, X. (2009). Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology*. 59(6): 584-592.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 69(2): 330-339.
- Chand-Goyal, T., and Spotts, R.A. (1996). Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. *Microbiological Research*. 151: 427-432.

- COI - Conselho Oleícola Internacional. Country Profiles.  
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/136-country-profiles>.  
Acedido a 22 de outubro de 2014.
- Corbo, M.R., Altieri, C., D'Amato, D., Campiello, D., Del Nobile, M.A., and Sinigaglia, M. (2004). Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 31: 93-104.
- Devi, N.N., and Prabakaran, J.J. (2014). Bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Centella asiatica*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*. 4(1): 34-43.
- Ding, T., Palmer, M.W., and Melcher, U. (2013). Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. *BMC Microbiology*. 13: 1.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljević, T., and Shah, N.P. (2007).  $\alpha$ -galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry*. 70: 375.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.-P., and Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3623-3630.
- Duo-Chuan, L., Zhen-Wei, L. and Jing, L. (2001). Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycological Research*. 105(2): 190-194.
- Ercolani, G.L. (1991). Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology*, 21: 35–48.
- Estatísticas Agrícolas (2012). Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas Oficiais, Edição 2013.
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R. and Mohammed, C. (2010). Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist*. 185: 893-908.
- Fakas, S., Kefalogianni, I., Makri, A., Tsoumpeli, G. Rouni, G., Gardeli, C., Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2010). Characterization of olive fruit microflora and its effect on olive oil volatile compounds biogenesis. *European Journal Lipid Science and Technology*. 112: 1024–1032.

- FAOSTAT, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/> Acedido a 5 de setembro de 2014.
- Filippovich, S.Y., Rybakov, Y.A., Afanasieva, T.P., and Bachurina, G.P. (2001) Characterization of lipoxygenase from fungi of the genus *Mortierella*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 3: 473–479.
- Fisher, M.M., Wilcox, L.W., and Graham, L.E. (1998). Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on charophycean green algae. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11): 4384-4389.
- Fokkema, N.J., and Schippers, B. (1986). Phyllosphere vs rhizosphere as environments for saprophytic colonization. *In* N. J. Fokkema and J. Van den Heuvel (ed.), *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press. 137–159.
- Gao, F.K., Dai, C. and Liu., X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*. 4: 1346-1351.
- Grimont, F., and Grimont, P. A. D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*. 137B: 165-175.
- Guo, B., Dai J.R., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., Ong, W., and Carte, B.K. (2000). Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *Journal of Natural Products*. 63: 602-604.
- Hallmann, J., Berg, G., and Schulz, B. (2006). Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms. *In* Schulz B., Boyle C., Sieber T.N. (Eds.) *Soil Biology*, 9: 299-319.
- Hepkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers Microbiology*. 4: 143.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624-653.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Surveswaran, S., Hyde, K.D., Corke, H., and Sun, M. (2009). Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*. (36): 69-88.

- Hunter, P.J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J.M., and Bending, G.D. (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the Lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 8117–8125.
- Husson, F., Pagot, Y., Kermasha, S., and Belin, J. M. (1998). *Fusarium proliferatum*: induction and intracellular location of a lipoxygenase. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 42–48.
- Husson, F., Thomas, M., Kermasha, S., and Belin, J. M. (2002). Effect of linoleic acid induction on the production of 1-octen-3-ol by the lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Penicillium camemberti*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 19(20): 363–369.
- Hyde, K., Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*. 33: 167 – 173.
- Ivanova, E.G., Doronina, N.V., Shepelyakovskaya, A.O., Laman, A.G., Brovko, F.A., and Trotsenko, Y.A. (2000) Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiology*. 69:646-651.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pulses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2761-2764.
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., and Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*. 100(1): 273-286.
- Karasu, N., Simsek, O., and Con, A.H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*. 60: 227–234.
- Kermasha, S., Perraud, X., Bisakowski, B., and Husson, F. (2002). Production of flavor compounds by hydroperoxide lyase from enzymatic extract of *Penicillium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 19(20): 479–487.
- Kinkel, L.L., Wilson, M., and Lindow, S.E. (2000). Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. *Microbial Ecology*. 39: 1–11.
- Knief, C., Delmotte, N., and Vorholt, J.A. (2011). Bacterial adaptation to life in association with plants – A proteomic perspective from culture to in situ conditions. *Proteomics*. 11: 3086–3105.

- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*. 6(12): 1244–1251.
- Lindow, S.L., and Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 1875–1883.
- Lu, Y., Chen, C., Chen, H., Zhang, J., and Chen, W. (2012). Isolation and Identification of Endophytic Fungi from *Actinidia macrosperma* and Investigation of Their Bioactivities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (Article ID 382742), 8 pages.
- Mac Faddin, J. F. (1985). Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. Williams & Wilkins. vol.1.
- MADRP (2007) Olivicultura – diagnóstico sectorial, 52 p.
- Magnani, G.S., Didonet, C.M., Cruz, L.M., Picheth, C.F., Pedrosa, F.O., and Souza, E.M. (2010). Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research*. 9(1): 250-258.
- Martin, K.J., and Rygiewicz, P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers develop for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*. 5: 28.
- Mejía, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Bael, S.V., Elizabeth, A., Hebbar, P., Samuels, G.J., Robbins, N. and Herre, E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*. 46: 4-14.
- Mendoza, A.R. and Sikora, R.A. (2009). Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl*. 54: 263-272.
- Mercier, J., and Lindow, S.E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 369-374.
- Mignard, S., and Flandrois. J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*. 67: 574-581.

- Monier, J.M., and Lindow, S.E. (2004). Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 346-355.
- Muller, T., and Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology *FEMS Microbiology Ecology*. 87: 2–17.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (1995). *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology.
- Newton, A.C., Gravouil, C., and Fountaine, J.M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of applied biology*. 157: 343–359.
- Omer, Z.S., Tombolini, R., Broberg, A., and Gerhardson, B. (2004). Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. *Plant Growth Regulation*. 43:93-96.
- Ownley, B.H., Gwinn, K.D., and Vega, F.E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*. 55: 113-128.
- Partida-Martínez, L.P., and Martin, H. (2011). The microbe-free plant: factor artifact? *Plant Science*. 2: 100.
- Patel, J. B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis*. 6: 313-321.
- Peñuelas, J., Rico, L., Ogaya, R., Jump, A.S., and Terradas, J. (2012). Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biology*. 14: 565–575.
- Pereira, E.L., Ramalhosa, E., Borges, A. Pereira, J.A., and Baptista, P. (2015). YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives (*Negrinha de Freixo* cv.). *Food Microbiology*. 46: 582–586.
- Peres, C.M., Marta Alves, M., Hernandez-Mendoza, A., Moreira, L. Silva, S., Bronze, S.M., Vilas-Boas, L., Peres, C., and Malcata, F.X. (2014). Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *Food Science and Technology* 59: 234-246.
- Perraud, X., and Kermasha, S. (2000). Characterization of lipoxygenase extracts from *Penicillium* sp.. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77: 335–342.

- Perraud, X., Kermasha, S., and Bisakowski, B. (1999). Characterization of a lipoxygenase extract from *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. 34: 819–827.
- Posada, F., and Vega, F.E. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*. 47(5): 284–289.
- Qadri, M., Johri, S., Shah, B.A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S.K., Abdin, M.Z., and Riyaz-Ul-Hassan S. (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*. (2): 8.
- Robl, D., Delabona, P., Mergel C.M., Rojas, J.D., Costa, P., Pimentel, I., Vicente, V.P. Pradella, J., and Padilla, G. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnology*. 13: 94.
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López FN. (2014). Fortification of table olive packing with the potential probiotic bacteria *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2. *Frontiers Microbiology*. 3(5): 467.
- Sachse, K., and Frey J. (2003). PCR Detection of Microbial Pathogens, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Sánchez-Ortiz, A., Romero-Segura, C., Sanz, C., and Pérez, A.G. (2012). Synthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil Is Limited by the Lipoxygenase Activity Load during the Oil Extraction Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 812–822.
- Schoch, CL., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. (2012). Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*. 109(16): 6241–6246.
- Schulz, B., and Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109: 661-686.
- Shweta, S., Züehlke, S., Ramesha, B.T., Priti, V., Kumar, P.M., Ravikanth, G., Spitteller, M., Vasudeva, R., and Shaanker, R.U. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (*Icacinaceae*) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*. 71: 117–122.

- Soliman, S.S.M., Trobacher, C.P., Tsao, R., Greenwood, J.S., and Raizada, M.N. (2013). A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. *BMC Plant Biology*. 13: 93.
- Stout, J.D. (1960). Bacteria of soil and pasture leaves at Claudelands show- grounds. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 3:413–430.
- Sunitha, V.H., Devi, D.N., and Srinivas, C. (2013). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*. 9(1): 01-09.
- Tefera, T., and Vidal, S. (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*. 54(5): 663–669.
- Tujula, N.A., Holmström, C., Mußmann, M., Amann, R., Kjelleberg, and S., Crocetti, G.R. (2006). A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. *Journal of Microbiological Methods*. 65: 604-607.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Rangel, D.E.N., and Roy, H.E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2: 149–159.
- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 828-840.
- Wang, X., Li, G., Jiang, D., and Huang, H.C. (2009). Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biological Control*. 50(2): 164-171.
- Wang, Y.H., Xu, L., Ren, W.M., Zhao, D., Zhu, Y.P., and Wu, X.M. (2012). Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*. 19: 364–368.
- Webster, J. A. (1988). U.S. patent 4,717,653.
- Wehr, H.M., and Frank, J.F. (2004). Standard methods for the examination of dairy products. 17th ed. American Public Health Association.
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink D.A.C., and Bending, G.D. (2008). Human pathogens and the phyllosphere. *Advances in Applied Microbiology*. 64:183-221.
- Woo, P. C. Y., Ng, K. H. L., Lau, S. K. P., Yip, K., Fung, A. M. Y., Leung, K., Tam, D. M. W., Que, T., and Yuen, K. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based identification system for identification of clinically

- significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1996-2001.
- Woodward, F.I., and Lomas, M.R. (2004). Vegetation dynamics - simulating responses to climatic change. *Biological Reviews*. 79: 643-670.
- Xu, J., Smyth, C.L., Buchanan, J.A., Dolan, A., Rooney, P.J., Millar, B.C., Goldsmith, C.E., Elnorn, J.S., Moore, J.E. (2004). Employment of 16 rDNA gene sequencing techniques to identify culturable environmental eubacteria in a tertiary referral hospital. *The Journal of Hospital Infection*. 57(1), 52-58.
- Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y., Royo, I., Vilella, D., Dez, M., Pelaez, F., Ruby, C., Kendall, R.L., Mao, X., Griffin, P., Calaycay, J., Zierath, J.R., Heck, J.V., Smith, R.G., and Moller, D.E. (1999). Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*. 284 (5416): 974-977.
- Zhang, L.X., Liu, H.P., Han, J.C., Gao, J.M., and Cheng, M.F. (2006). Isolation and screening of endophytic antifungal fungi from tomato. *Journal of Shanxi Agricultural University*. 25: 30-3.

# Capítulo 3

**Characterization of olive fruit epiphyte and endophyte microflora and its potential in the development of new olive-derived products**



**Characterization of olive fruit epiphyte and endophyte microflora and its potential in the development of new olive-derived products**

Rui Pereira, José Alberto Pereira, Paula Baptista\*

Manuscript in preparation.

Mountain Research Centre (CIMO) / School of Agriculture, Polytechnic Institute of Bragança, *Campus* de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.



## Abstract

The above-ground parts of plants (phyllosphere) harbor a diverse microbial community, both as epiphytes on the plant surface and within plant tissues as endophytes, that play a crucial role for plant health and growth. Much of the work on phyllosphere microbiology has been focused on leaves, whereas fruits have been rarely studied. In this work the diversity of endophytic and epiphytic microbial community associated with olive fruit of three Portuguese cultivars (Madural, Cobrançosa and Verdeal Transmontana) was assessed for the first time. The effect of plant cultivar on microbial community inhabiting olive fruit was also evaluated. Bacteria and fungi were isolated from fresh olive fruits in plate count agar and in potato dextrose agar medium, respectively, and the isolates obtained were identified by sequencing the 16S (for bacteria) and the ITS region (for fungi) of rRNA genes. A total of 270 isolates (122 bacteria, 151 filamentous fungi) belonging to 41 taxa (6 bacteria, 35 filamentous fungi) were isolated from olives of the three cultivars. Overall, the epiphytic community was most diverse (35 taxa) and rich (227 isolates) than endophytic community (13 taxa, 43 isolates). In both communities the specie most abundant was the unidentified bacteria sp. 6, followed by *Davidiella tassiana* and *Penicillium expansum* within epiphytes, or by *Pyronema domesticum* and *Fusarium lateritium* within endophytes. Both communities showed low similarity on species composition, with a Sørensen index of 0.26. Olive tree cultivar was found to influence microbial community structure. The diversity and richness of fungal endophytes was higher on olives of cvs. Verdeal Transmontana (5 taxa, 12 isolates) and Madural (5 taxa, 10 isolates); whereas of epiphytes was on olives of cvs. Cobrançosa (16 taxa, 32.68 cfu/cm<sup>2</sup>) and Madural (13 taxa, 32.88 cfu/cm<sup>2</sup>). The frequency of fungal colonization was highest in olives of cv. Verdeal Transmontana and Madural (17% each) whereas of bacteria was in olives of cv. Cobrançosa (10%) and Madural (8%). The results show that both the habitat (endophyte vs. epiphyte) properties and the plant cultivar are important in determining the structure and diversity of the bacterial and fungal community associated to olive fruit.

Key-words: *Olea europaea* L., bacteria, fungi, Madural, Verdeal Transmontana, Cobrançosa.

## Introduction

The phyllosphere is the habitat provided by aerial parts of the plant, that supports a large number and diversity of microorganisms including bacteria, yeasts, oomycetes and fungi (Lindow & Brandl, 2003). These microorganisms may be found in the interior of plant tissues (endophytes) as well as on plant's surface (epiphytes) (Lindow & Brandl, 2003; Monier & Lindow, 2004). The members of both microflora interact with the plant host, among themselves, and with other organisms (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011), which result may have important implications for plant health (Lindow & Brandl, 2003; Muller & Ruppel, 2014). They can promote plant growth through the production of hormones (Ivanova et al., 2000; Omer et al., 2004), and be involved in the protection of plants from pathogenic microorganisms (Mendoza & Sikora, 2009; Wang et al., 2009) and insect pests (Posada & Vega, 2006; Tefera & Vidal, 2009). Additionally, they fulfil important functions in the control of enteric human pathogens on plants, leading to improved safety of fresh fruits and vegetables (Berger et al., 2010; Whipps et al., 2008). This is a food category with markedly increasing consumption and increasing illness outbreaks in recent years (Warriner et al., 2009). Phyllosphere microorganisms, specially endophytes, are also recognized as repositories of biologically active substances and enzymes that can be exploited in food and pharmaceutical industry (Schulz et al., 2002).

Although endophytic and epiphytic microflora is in close proximity and interacts with each other, most studies focus on only one of these groups, and few consider interactions among them, or between fungi and bacteria (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). An integrative approach would lead a better understanding of the assembly, structure, and function of these microorganisms on the phyllosphere (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). This knowledge will facilitate the biotechnological application of these microorganisms in the agriculture, to protect plants and promote plant growth, as well as in food industry by avoiding human pathogenic in plant food (Muller & Ruppel, 2014). Although there are few studies comparing epiphytic and endophytic communities, comparisons within pine, coffee and *Arabidopsis thaliana* leaves indicate that endophytic communities are distinct from epiphytic ones (Bodenhausen et al., 2013; Legaul et al., 1989; Santamaria & Bayman, 2005).

So far, research on phyllosphere microorganisms has been restricted mostly to leaves,

and only few are devoted to other plant organs such as fruits (Lindow & Brandl, 2003; Müller & Ruppel, 2014; Vorholt, 2012). Although endophytes have been yet isolated from some fresh fruits including cherries (Dugan & Roberts, 1994), papaya fruits (Krishnan et al., 2012), grapes and avocado (Prasard & Dagar, 2014), and coffee fruits (Miguel et al., 2013), there is very limited information on isolation and characterization of epiphytes and endophytes from fresh olives. Most of the studies on olives reported the microbial diversity and dynamics over the table olive fermentation process (Heperkan, 2013). As far as we known, only Fakas et al. (2010) have evaluated the diversity of fungi, yeast and bacteria associated to olive fruits of the Greek cultivar “Amfissis” stored under industrial conditions. Recently, Pereira et al. (2015) have similarly evaluated the diversity of yeasts on fresh olive pulp of the Portuguese cultivar Negrinha de Freixo. The investigation of endophytic and epiphytic microorganisms on olives has several practical implications. These microorganisms could be explored as antagonists of plant pathogens and as producers of compounds with value on olive oil industry. It was showed that naturally occurring microorganisms in olives can contribute to the biogenesis of olive oil volatile compounds and that some fungal species of this microflora (e.g. *Aspergillus*) could potentially be used to enhance the aroma of olive oil compounds (Fakas et al., 2010). Therefore, the aim of this study was to evaluate the diversity of fungal and bacterial inhabiting the surface and the inner tissues of olives from three different Portuguese cultivars, Cobrançosa, Verdeal Transmontana and Madural, by using culturing-dependent method.

## **Material and methods**

### ***Sampling***

Olive fruits, at a maturity index between 1 and 2 (Hermoso et al. 1991), were sampled from an orchard located in Paradela (N 41° 32.593'; W 007° 07.445'), Mirandela region in the Northeast of Portugal, in November of 2013. The orchard has 3 ha with a planting density of 7 x 7 m; trees have more than 40 years; prune is made each three years; it is not irrigated and the soil is tilled 2–3 times each year. The olive grove was managed through integrated production guidelines (Malavolta & Perdakis 2012). In this orchard were selected six olive trees of cultivar Madural, and seven

olive trees of each cultivar Verdeal Transmontana and Cobrançosa. From each tree, approximately 200 g of olive fruits was handpicked all around the perimeter of the tree at the operator height. Samples were placed in individual plastic bags, labelled, and transported to the laboratory in an icebox. The olives were stored at 4°C and processed within 48h of their collection for the isolation of epiphytic and endophytic microorganisms.

### *Isolation of epiphytic and endophytic microorganisms from olives*

For the isolation of epiphytic microorganisms were used the serial dilution technique. In this technique approximately 25 g of olives from each tree was added to 25 mL of sterile potassium phosphate buffer at pH 7.0 (8 g/L NaCl, 0.20 g/L KCl, 1.4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) with 0.010% (v/v) Tween 80, then shaken on a rotary shaker (200 rpm) for 30 minutes at room temperature. The olives were then removed and the resulting suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, at room temperature. The pellet obtained was re-suspended in 4 ml of sterile potassium phosphate buffer at pH 7.0, and further diluted serially (1:10) in the same buffer. One ml of each dilution (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-3</sup>) was further plated (using the pour plate method) in triplicate onto Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with 0.01% (w/v) chloramphenicol (Liofilchem) for fungal/yeast isolation, and onto Plate Count Agar (PCA), supplemented with 0.001% (w/v) cycloheximide (Sigma) for bacterial isolation.

For endophytic microbial isolations, four olives per tree without any obvious lesions were randomly selected, washed in running water, and further surface sterilized through sequential immersion in 70% (v/v) ethanol for 2 min, 3-5% (v/v) sodium hypochlorite for 3 min, 70% (v/v) ethanol for 1 min and rinsed three times (1 min each) with sterile distillate water. After being dried in sterile filter paper, two olives were cut into segments (*ca.* 5 x 5 mm) and transferred onto the same medium used to isolated epiphytes (PDA and PCA). A total of 200 olive fragments were inoculated having 5 fragments in each plate (20 olive trees x 2 culture medium x 5 olive segments). The efficiency of the surface sterilization procedure was ascertained by imprinting onto PDA and PCA Petri plate surface sterilized olives. Plates were incubated at 25°C (for PDA) and at 37°C (for PCA) and were observed every day for

microbial growth and colonies counting. To determine the number of microorganisms adhered to the olive epidermis, the results of epiphytes were expressed as cfu/cm<sup>2</sup>, using the formula of a prolate spheroid for the approximate calculus of olive surface from the longitudinal and transverse axes of fruits (Weisstein, 2013). For the Cobrançosa, Verdeal Transmontana and Madural fruits used in the present study, the average area was 9.43±1.31 cm<sup>2</sup>, 8.97±0.680 cm<sup>2</sup> and 8.07±0.620 cm<sup>2</sup> respectively. The colonies were subculture on fresh medium until pure epi/endophytic cultures were obtained. Pure cultures of each isolate were preserved and deposited in the culture collection of the Polytechnic Institute of Bragança (School of Agriculture).

### ***Identification of microbial isolates***

A combination of morphological and molecular approach was used to identify microbial isolates. At the first, isolates from pure cultures were grown on PDA or PCA medium for 2-15 days, depending on their growth rate. These cultures were examined periodically, and groups of strains were formed according to their morphological similarity by analysing macro and microscopic characters using standard manuals [e.g. Crous et al. (2009) for fungi and (Barrow & Feltham, 1993) for bacteria]. One representative strain for each morphotype was selected for further molecular identification. Fungi were identified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (rDNA). This is the recommended genomic region to be used as the DNA barcode marker for fungi (Schoch et al., 2012). Genomic DNA was extract from spores or mycelial mat following the protocol of Oliveira et al. (2012). The ITS region (ITS1, 5.8S, ITS2) was amplified using the universal ITS1 and ITS4 primers (White et al., 1990), in a PCR protocol formerly described by Oliveira et al. (2012). Bacteria were identified by sequencing of the V1-V4 region of the 16S ribosomal RNA gene (rRNA). Isolation of genomic DNA was performed by transferring a loopful of bacteria cells, removed from a 24 hour-old growing pure culture on PCA medium, into a microtube containing 800µL of Lysis buffer (5% Chelex 100, 0.5% SDS, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) and boiled for one minute. The mixture was then incubated on ice for 5 min, mixed on a vortex for 10 min and centrifuged at 13 000 rpm for 5 min. The supernatant was collected to another microtube and one volume of isopropanol (-20°C) and 80 µL of

sodium acetate 3M pH 5.5 were added. This mixture was slowly homogenized and incubated at -20°C for 10 min. After centrifugation at 13 000 rpm (4°C) for 10 min and discarding the supernatant, the DNA was washed with 400 µl of 70 % ethanol and centrifuged once more. The supernatant was discarded and DNA was re-suspended in 50 µL of ultra-pure water and stored at -20°C until use. The amplification of 16S rDNA was carried out in a reaction with a final volume of 50 µl containing 0.5-10 ng of total DNA, 0.2 µM of each primer V1F and V4R (Cai et al., 2013), 0.2 mM dNTP Mix (Fermentas), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), 1x GoTaq® Flexi buffer (Promega) and 0.05 U GoTaq® DNA polymerase (Promega). Amplifications were carried out in the MyCycler Thermal Cycler (BIO-RAD) using a temperature gradient protocol as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 50 sec at 94°C, 30 sec at 47°C, 90 sec at 72°C, and a final 5 min extension at 72°C.

The PCR products (~650 pb for fungi and ~750 pb for bacteria) were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) using the primers ITS1 and ITS4 (for fungi) and V1F and V4R (for bacteria). The obtained DNA sequences were analyzed with DNASTAR v. 12.1 software, and fungal identification was performed using the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and BLAST algorithm. Blast results were sorted according to the higher identity score and the lowest E-value. For sequence identities >98%, the genus and species were accepted; for sequence identities between 95% and 97%, only the genus was accepted; and for sequence identities <95%, isolates were labelled as 'unknown' fungi or bacteria. Each fungal taxon was taxonomically classified according to the Index Fungorum Database ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)).

### ***Data analysis***

The diversity of fungal and bacterial endophytes and epiphytes within the olive tree cultivars (Madural, Cobrançosa and Verdeal Transmontana) was evaluated at the level of their richness (number of different taxa), their abundance (number of isolates per taxa), and also by computing the most widely used indices of species diversity, such as Simpson's Reciprocal Index (1/D) and Shannon–Wiener (H). Both indices combine species richness and abundance, in different ways (Magurran, 2004), and were computed in *Species Diversity and Richness* v. 4.0 (Seaby &

Henderson, 2006). The frequency of colonization (FC, %) of an endophyte taxon was calculated as the total number of olive tissue segments colonized by each endophyte divided by the total number of olive segments surveyed. The relative abundance (RA, %) of an epiphyte taxon was determined as the total number of isolates of a taxon divided by the total number of isolates of all taxa.

Sørensen's quotient of similarity (QS) was calculated to examine the similarity of microbial assemblages in olive interiors and on olive surfaces and to compare the similarity with those previously reported in other host trees (Osono & Mori, 2004):  $QS = 2a/(2a + b + c)$  where a is the number of common species and b and c are the numbers of species specific to the interior and the surface, respectively. The Sørensen index is a very simple measure of beta diversity, ranging from 0 (no species overlap) to 1 (complete overlap).

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was carried out to explore the similarity of microorganisms' community among olive tree cultivars (Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana). This analysis ranks microorganisms communities of each cultivar surveyed (represented by points) in ordination space in a way that the distance between two points is inversely proportional to their similarity (Kruskal, 1964). Therefore, points closer together are more similar in microorganism species composition than those further apart. The correspondence of the ordination diagram to the distances is described by a stress value (Kruskal's stress), with values less than 0.2 representing good ordination plots and greater than 0.3 provides a poor representation (Clarke, 1993). NMDS was performed by using Jaccard's and Bray-Curtis similarities matrices, because they consider different kinds of information. Jaccard's index only compares presence or absence of taxa among samples, disregarding species abundance (Magurran, 2004). Bray-Curtis index compares taxa presence or absence and abundance among samples. This coefficient ignores cases in which the species is absent in both community samples, and is strongly influenced by the abundant species so rare species add very little influence (Bray & Curtis, 1957). The ordination analyses were conducted on presence/absence data (Jaccard's index) and raw data (Bray-Curtis coefficient).

Analysis of similarities (ANOSIM) was used to test significant differences on microorganism species composition between olive tree cultivars, with a significance level of 0.05. This analysis compares species composition between-groups (olive tree

cultivars) and generates an R-value ranging from 0 (completely similar) to 1 (completely dissimilar) (Clarke & Gorley, 2001). This analysis was conducted using Bray–Curtis distance matrices (obtained from raw abundance data), with 1000 permutations. When a significant difference was observed, similarity percentage analyses (SIMPER) were performed to reveal which taxa contributed to dissimilarity between tree cultivars (with 0 being completely similar and 100 being completely dissimilar). Fungal taxa that accounted for more than 90% of dissimilarity were indicated. All multivariate analyses were done using the *Community Analysis Package* v. 4.0 (Henderson & Seaby, 2007).

Significant differences among samples were determined by analysis of variance (ANOVA), using SPSS software, version 21.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.) and averages were compared using Tukey's ( $p < 0.05$ ).

## **Results and Discussion**

The phyllosphere comprise the surface and interior of the aerial parts of vascular plants, which are colonized by a rich and varied microbial community, called epiphyte and endophyte, respectively (Newton et al., 2010). The members of both microflora interact with the plant host, among themselves, and with other organisms (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011), which result may have practical importance in both crop productivity and protection (Newton et al., 2010; Vorholt, 2012), and food security (Leveau, 2015). Most studies on phyllosphere microorganisms have focused only on endophytic or epiphytic group, and few consider interactions among them, or between fungi and bacteria. A more integrative approach to the biodiversity of the phyllosphere may lead to a better understanding of the behaviour of microorganisms in this habitat (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011) and will help to improve their use in future applications in agriculture and food security and food safety. Both epiphyte and endophyte microbial community of fruits have been less studied when compared to leaves (Lindow & Brandl, 2003). Similarly, a limited number of studies of phyllosphere microbial population differences at the cultivar level (i.e., within a species) have been conduct. Therefore, the current study was undertaken to assess the diversity of fungal and bacterial inhabiting the surface and the inner tissues of olives from three different cultivars, Cobrançosa, Verdeal Transmontana and Madural, by

using culturing-dependent method. To our knowledge, there are no previous reports on the isolation and cultivation of endophytes and epiphytes from olives. These microorganisms may potentially be useful in the biocontrol of olive tree pathogens and as producers of compounds, namely enzymes such as lipoxygenase, with interest in the olive oil industry. There is an increasing interest in these enzymes due to their recognized role in the determination of olive oil quality, in terms of aroma and flavor (Fakas et al., 2010).

### ***General overview of fungal and bacterial community of olives***

A total of 270 isolates (122 from bacteria and 151 from filamentous fungi) belonging to 41 taxa (35 filamentous fungi and 6 bacteria) were isolated from olives of the three cultivars (Table 1). Among these, five strains showed <95% sequence identity with the ones deposited in GenBank and were labelled as “unknown” (Table S1). The ITS sequence of bacteria sp. 6 was not specified to the species level or even to the genus level in the GenBank sequence database to name it to specie. The fungal taxa identified belonged to 24 genera and 19 families, whereas bacteria taxa belonged to 5 genera and 5 families (Table 1). The genera comprising more diversity in fungi were *Penicillium* (4 species) and *Cladosporium* (3 species) and in bacteria all the genera were represented by only one specie. In terms of richness, *Davidiella tassiana* and the unidentified specie sp. 6 were the dominant within fungi and bacteria, respectively. The specie *D. tassiana* as well as its anamorph *Cladosporium herbarum* are one of the most common environmental fungi isolated worldwide (Schubert et al., 2007). It abundantly occurs as endophyte (Rosa et al., 2010) as well as epiphyte (Guimarães et al., 2011).

**Table 1** – Frequency of colonization (FC, %) of each endophyte (End) and frequency of occurrence (FO, %) of each epiphyte (Epi) isolated from olives of the three cultivars Cobrançosa, Verdeal Transmontana and Madural.

Family, genera and species	Cobrançosa		Verdeal Transmontana		Madural		Total	
	End	Epi	End	Epi	End	Epi	End	Epi
	FC %	FO %	FC %	FO %	FC %	FO %	FC %	FO %
<b>Fungi</b>								
<b>Backusellaceae</b>								
<i>Backusella</i>								
<i>B. recurva</i> (E.E. Butler) Walther & de Hoog	0	0	2.9	0	0	0	2.3	0
<b>Cladosporiaceae</b>								
<i>Cladosporium</i>								
<i>C. cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	0	6.8	0	0	0	6.3	0	5.1
<i>C. cucumerinum</i> Ellis & Arthur	0	0	0	0.36	0	0	0	0.080
<i>C. uredinicola</i> Speg.	0	0	0	0.18	0	2.4	0	1.2
<b>Davidiellaceae</b>								
<i>Davidiella</i>								
<i>D. tassiana</i> (De Not.) Crous & U. Braun	0	0	0	0.58	0	28	0	14
<b>Diaporthaceae</b>								
<i>Phomopsis</i>								
<i>P. columnaris</i> D.F. Farr & Castl.	0	0.30	0	0	0	0	0	0.090
<b>Dothioraceae</b>								
<i>Aureobasidium</i>								
<i>A. pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	0	0.44	0	0	3.3	0.17	2.3	0.17

<i>Pringsheimia</i>									
<i>P. smilacis</i> (Bonord.) E. Müll.	0	0	2.9	0	0	0	2.3	0	
<b>Glomerellaceae</b>									
<i>Colletotrichum</i>									
<i>C. dematium</i> (Pers.) Grove	0	14	0	0	0	0	0	4.1	
<b>Hymenochaetaceae</b>									
<i>Inonotus</i>									
<i>I. hispidus</i> (Bull.) P. Karst.	0	4.4	0	0	0	0	0	1.3	
<b>Marasmiaceae</b>									
<i>Marasmius</i>									
<i>M. rotula</i> (Scop.) Fr.	0	0	2.9	0	0	0	2.3	0	
<b>Nectriaceae</b>									
<i>Fusarium</i>									
<i>F. lateritium</i> Nees	0	4.5	5.7	0	0	0	4.7	1.4	
<i>F. proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg	0	10	0	0	0	0	0	3.0	
<i>Aphanocladium</i>									
<i>A. album</i> (Preuss) W. Gams	0	0	0	0	0	5.7	0	2.7	
<b>Pezizaceae</b>									
<i>Chromelosporium</i>									
<i>C. carneum</i> (Pers.) Hennebert	0	5.6	0	1.8	0	2.7	0	3.4	
<b>Physalacriaceae</b>									
<i>Armillaria</i>									
<i>A. gallica</i> (J.B. Barla) H. Romagnesi sensu Korhonen	0	0	0	0	3.3	0	2.3	0	
<b>Pleosporaceae</b>									
<i>Alternaria</i>									

<i>A. carthami</i> S. Chowdhury	0	0	2.9	0	0	0	2.3	0
<i>Epicoccum</i>								
<i>E. nigrum</i> Link	0	0	0	0	0	0.77	0	0.37
<i>Ulocladium</i>								
<i>U. dauci</i> E.G. Simmons	0	0.92	0	0	0	0	0	0.27
<b>Psathyrellaceae</b>								
<i>Coprinellus</i>								
<i>C. xanthothrix</i> (Romagn.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson	0	0	0	0.40	0	0	0	0.090
<b>Pyronemataceae</b>								
<i>Pyronema</i>								
<i>P. domesticum</i> (Sowerby) Sacc.	2.9	1.7	0	0.80	3.3	0	4.7	0.67
<b>Sclerotiniaceae</b>								
<i>Botrytis</i>								
<i>B. fabae</i> Sardiña	0	0	0	0.96	0	0	0	0.21
<b>Sordariaceae</b>								
<i>Sordaria</i>								
<i>S. lappae</i> Potebnia	0	0	0	0	0	0.46	0	0.22
<b>Trichocomaceae</b>								
<i>Penicillium</i>								
<i>P. crustosum</i> Thom	2.9	0	0	12	0	0	2.3	2.5
<i>P. expansum</i> Link	0	19	0	0.39	0	0	0	5.7
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	0	0.29	0	0	0	2.3	0	1.2
<i>P. swiecickii</i> K.M. Zalesky	0	0.30	0	0	0	0	0	0.090
<b>Umbelopsidaceae</b>								
<i>Umbelopsis</i>								

<i>U. versiformis</i> Amos & H.L. Barnett	0	0	0	0	0	2.2	0	1.0
<b>Xylariaceae</b>								
<i>Biscogniauxia</i>								
<i>B. mediterranea</i> (De Not.) Kuntze	0	0.29	0	4.0	0	3.6	0	2.7
Unidentified Family								
<i>Chalara</i>								
<i>C. microchona</i> W. Gams	0	0	0	0	0	1.3	0	0.61
<b>Unknown</b>								
Sp. 1	0	2.0	0	0	3.3	0	2.3	0.58
Sp. 2	2.9	0	0	2.8	0	0	2.3	0.62
Sp. 3	0	0	0	0	0	0.26	0	0.13
Sp. 4	0	2.5	0	0	0	0	0	0.74
Sp. 5	0	0	0	0	3.3	0	2.3	0
<b>Bacteria</b>								
<b>Bacillaceae</b>								
<i>Bacillus</i>								
<i>B. pumilus</i>	0	1.5	0	0	0	0	0	0.45
<b>Enterobacteriaceae</b>								
<i>Hafnia</i>								
<i>H. alvei</i> (Bonord.) Moller	0	3.0	0	18	0	1.8	0	5.7
<b>Dermabacteraceae</b>								
<i>Brachybacterium</i>								
<i>B. paraconglomeratum</i> Takeuchi	0	0	0	0	0	6.1	0	2.9
<b>Microbacteriaceae</b>								
<i>Curtobacterium</i>								

<i>C. flaccumfaciens</i> Hedges	0	0	0	0.38	0	0.090	0	0.13
<b>Paenibacillaceae</b>								
<i>Paenibacillus</i>								
<i>P. taichungensis</i> (Pers.) Lee	0	0	0	8.0	0	0	0	1.8
<b>Unidentified species</b>								
Sp. 6	10	23	4.3	50	8.3	36	17	35
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

### *Comparison of endophytic and epiphytic communities*

The communities of endophytes and epiphytes inhabiting olives of the three cultivars differed markedly in the diversity and richness (Table 2). Overall, the epiphytic community was most diverse (35 taxa) and rich (227 isolates) than endophytic community (13 taxa, 43 isolates). The high diversity found on the olive surface was corroborated by the Simpson and Shannon-Wiener indices estimate (Table 2). To our knowledge, there is no data regarding the comparison of endophytes and epiphytes communities on fresh fruits. Therefore, the results of this study are compared with similar studies performed on leaves. The higher diversity and abundance of microorganisms in the surface than in the interior of the aerial parts of vascular plants have been previously reported (Osono, 2014). For example, in *Camellia japonica* was observed greater number of fungal species on the leaf surface (52) than in the interior (44) (Osono, 2008). The same result was observed on leaves of *Alnus nepalensis*, *Castanopsis hystrix* and *Schima walichii* (Kayini & Pandey, 2010). Sørensen's QS of all tested cultivars for the endophytic and epiphytic bacterial and fungal assemblages was 0.26 that indicated few species overlap. In fact, among 41 taxa, only six are common to both communities (Table 1). Similarly, previous studies on forest tree leaves observed low similarity between endophytic and epiphytic fungal communities, with an average of Sørensen's QS index of 0.33 (ranging from 0.12 to 0.79) (Osono, 2014).

Surprisingly, the overall diversity and richness of fungal taxa was higher than the bacterial taxa in both endophytic (fungi: 28 isolates belonging to 12 taxa; bacteria: 15 isolates of one taxa) and epiphytic (fungi: 120 belonging to 29 taxa; bacteria: 107 isolates belonging to six taxa) communities (Table 2). We expected higher diversity and richness of bacteria, especially on the surface of the olives, based on previous reports for leaf samples (Finkel et al., 2011; Lindow & Brandl, 2003). These variations could be related with differences on morphological and physiochemical characteristics between the two plant organs surveyed (leaves and olives). Previous studies on leaves have been shown that a range of plant physiochemical characteristics, specially related with the water and soluble carbohydrate contents of the leaves (Hunter et al., 2010), and levels of phenolic compounds (Yadav et al., 2005), play an important role in determining patterns of bacterial phyllosphere

colonization. Therefore, we speculate that chemical differences between leaves and fruits could partly explain the higher richness of fungi. Previous studies have been reported differences on chemical composition between leaves and fruits of Portuguese olive tree cultivars, especially in phenolic compounds (Pereira et al., 2007; Vinha et al., 2005). In addition, the study of culturable microorganisms is recognised to be a method-dependent process (Hyde & Soyong, 2008), being the identity and number of isolates obtained influenced by several experimental variables that can affect the comparability of endophytes/epiphytes datasets.

**Table 2** – Richness and diversity of fungal and bacteria (in brackets) endophytes and epiphytes isolated from olives of the three cultivars Cobrançosa, Verdeal Transmontana and Madural. Frequency of colonization of fungal and bacteria endophytes are also shown. Different superscript lower case letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between cultivars.

	<b>Parameters</b>	<b>Cobrançosa</b>	<b>Verdeal Transmontana</b>	<b>Madural</b>	<b>Total</b>
<b>Endophytes</b>	Total nº of isolates	6 (7)	12 (3)	10 (5)	28 (15)
	Average nº of isolates per tree	0.86±0.69 <sup>a</sup> (1.0±1.0 <sup>a</sup> )	1.7±1.1 <sup>a</sup> (0.43±0.79 <sup>a</sup> )	1.7±1.5 <sup>a</sup> (0.83±1.3 <sup>a</sup> )	1.4±1.1 <sup>a</sup> (0.75±1.0 <sup>a</sup> )
	Total nº of taxa	3 (1)	5 (1)	5 (1)	12 (1)
	Average nº of taxa per tree	0.71±0.49 <sup>a</sup> (0.71±0.49 <sup>a</sup> )	1.4±0.53 <sup>a</sup> (0.29±0.49 <sup>a</sup> )	1.5±1.2 <sup>a</sup> (0.33±0.52 <sup>a</sup> )	1.2±0.83 <sup>a</sup> (0.45±0.51 <sup>a</sup> )
	Frequency of colonization (%)	8.5 (10)	17 (4.3)	17 (8.3)	14 (7.5)
	Simpson's Reciprocal Index	5.0 (1.0)	6.6 (1.0)	9.0 (1.0)	17 (1.0)
	Shannon-Wiener information index	1.1 (0)	1.6 (0)	1.6 (0)	2.4 (0)
<b>Epiphytes</b>	Total nº of isolates (cfu/cm <sup>2</sup> )	33 (9.1)	13 (21)	33 (24)	79 (54)
	Average nº of isolates (cfu/cm <sup>2</sup> ) per tree	4.7±2.6 <sup>a</sup> (1.3±1.2 <sup>b</sup> )	1.9±0.84 <sup>b</sup> (3.0±2.6 <sup>a</sup> )	5.5±4.6 <sup>a</sup> (4.0±4.0 <sup>a</sup> )	3.9±3.2 <sup>a</sup> (2.7±2.9 <sup>a</sup> )
	Total nº of taxa	16 (3)	11 (4)	13 (4)	29 (6)
	Average nº of taxa per tree	5.3±1.7 <sup>a</sup> (1.2±0.49 <sup>a</sup> )	2.7±0.95 <sup>b</sup> (1.4±0.53 <sup>a</sup> )	5.0±1.4 <sup>a</sup> (1.5±0.55 <sup>a</sup> )	4.3±1.8 <sup>a</sup> (1.4±0.50 <sup>a</sup> )
	Simpson's Reciprocal Index	16 (1.8)	8.0 (1.5)	10 (1.7)	19 (1.4)
	Shannon-Wiener information index	2.6 (0.43)	2.2 (0.68)	2.3 (0.77)	3.1 (0.72)

The comparison of endophytic and epiphytic communities of olives of all the three cultivars also showed differences on composition (Table 1). Overall, the endophytic community of the olives was dominated by the bacteria sp. 6 (34.9%) and by the fungi *Pyronema domesticum* (9.30%) and *Fusarium lateritium* (9.30%), representing together 53.5% of the total isolates. The majority of the species identified within this community were represented by few isolates (46.5% of the total species were represented by less than three isolates). The taxa identified from the inner tissues of olives have been considered as belonging to ubiquitous endophyte genera (e.g. *Alternaria*, *Fusarium*, *Pyronema* and *Penicillium*), which has been isolated from many plants in most parts of the world (Linaldeddu et al., 2011; Moricca et al., 2012; Sun et al., 2012). The fungi *P. domesticum* and *F. lateritium* were also previously found to be one of the most abundant endophytes. *F. lateritium* has been reported in numerous plant hosts species, mainly woody and fruit trees, where it causes wilt, tip or branch dieback, and cankers (Gerlach & Nirenberg, 1982). *P. domesticum* has been reported in tree fruits such as *Persea americana*, being also one of the most abundant (Hakizimana et al., 2011). In the epiphytic community, the families comprising more diversity are from fungi, namely Trichocomaceae (4 species), Cladosporiaceae and Nectriaceae (3 species each), and Pleosporaceae (2 species) (Table 1). The most diverse genera were *Penicillium* (4 species), *Cladosporium* (3 species) and *Fusarium* (2 species). Bacterial epiphytic community is represented by few genera (only 5). The majority of these bacteria and fungi genera have commonly been cited as epiphytes of several plant species such as apple trees (He et al., 2012) and banana (Alvindia & Natsuaki, 2008). The overall epiphytic community was dominated by the bacteria sp. 6 (35.1%), and by the fungi *Davidiella tassiana* (13.6%) and *Penicillium expansum* (5.67%), representing together 54.4% of the total isolates. From the total species identified in this community, 45.6% were represented by less than three isolates. Interestingly, the bacteria sp. 6 was the most abundant taxa found on both epiphytic and endophytic community, suggesting that this specie is a dominant member of olives microflora. The fungi *D. tassiana* and *P. expansum* have been also found as epiphytes on grapes (Verginer et al., 2010) and in apple fruit (Viñas et al., 1998), respectively. The first specie has been associated to the production of volatile metabolites potentially influencing the character of the wine (Verginer et al., 2010), whereas *P. expansum* is one of the most prevalent post-harvest rots that infects apples worldwide (Viñas et al., 1998).

### *Comparison of microbial communities between olive tree cultivars*

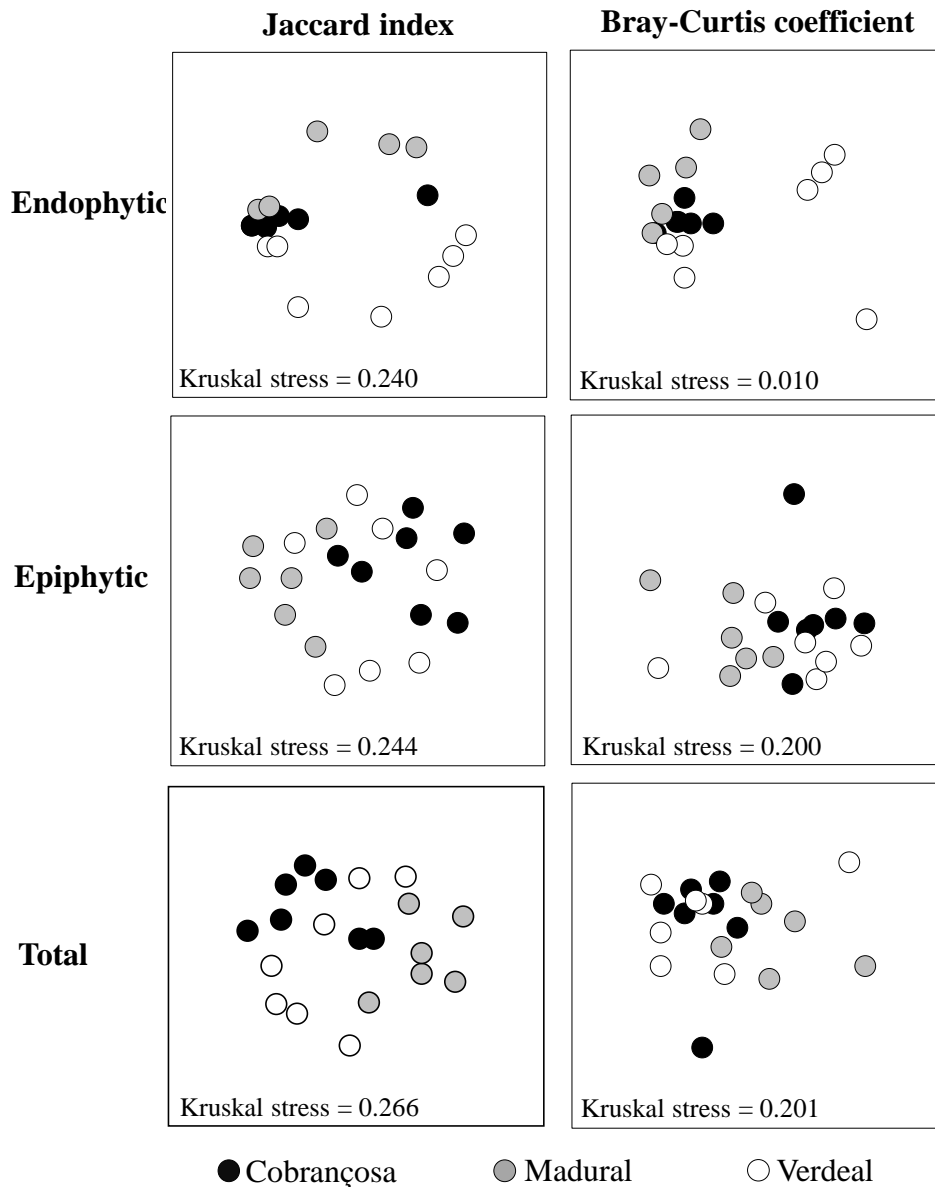
The diversity and abundance of epiphytes and endophytes differed between the olive tree cultivars (Table 2). Endophytic fungi were most diverse and abundant on olives of cvs. Verdeal Transmontana (5 taxa, 12 isolates) and Madural (5 taxa, 10 isolates) than on Cobrançosa (3 taxa, 6 isolates). This result was corroborated by Simpson and Shannon-Wiener diversity indices calculate. Nevertheless, the average number of endophytic fungal taxa and isolates obtained from each cultivar per tree was similar, with values ranging from 0.71 to 1.5 and from 0.86 to 1.7, respectively. The endophytic fungi community of the cv. Cobrançosa was dominated by *Penicillium crustosum* and *P. domesticum*, whereas in the cv. Verdeal Transmontana was dominated by *F. lateritium* and in the cv. Madural by *Aureobasidium pullulans*, *Armillaria gallica* and *P. domesticum* (Table 1). Fungi belonging to the genera *Alternaria*, *Aureobasidium* and *Penicillium* have been previously cited as endophytes of leaves and twigs of *Olea europaea* L. (Fisher et al., 1992; Sia et al., 2013). A single bacterial colony was identified among endophytic community, being its abundance higher in the cv. Cobrançosa (7), followed by Madural (5) and Verdeal Transmontana (3) (Table 1 and 2). Overall colonization rate of fungi was highest in olives of cv. Verdeal Transmontana and Madural (17% each) whereas of bacteria was in olives of cv. Cobrançosa (10%) and Madural (8%) (Table 2).

Epiphytic microbial composition was also different among the three olive tree cultivars (Table 2). The diversity and abundance of fungal epiphytes was found to be higher on olives from cvs. Cobrançosa (16 taxa, 32.7 cfu/cm<sup>2</sup>) and Madural (13 taxa, 32.9 cfu/cm<sup>2</sup>) than on cv. Verdeal Transmontana (11 taxa, 13.0 cfu/cm<sup>2</sup>), which was further corroborated by the Simpson and Shannon-Wiener diversity indices. The last cultivar also displayed significantly lower number of epiphytic fungal taxa and isolates per tree when compared to cvs. Cobrançosa and Madural. Of the fungal epiphytes, *P. expansum*, *P. crustosum* and *D. tassiana* were the most dominant species of cv. Cobrançosa, Verdeal Transmontana and Madural, respectively (Table 1). Bacteria were found to be more abundant on the olives surface of cvs. Madural (24.0 cfu/cm<sup>2</sup>) and Verdeal Transmontana (21.0 cfu/cm<sup>2</sup>) (Table 2). Both cultivars also showed significantly higher average number of bacteria colonies per tree than cv. Cobrançosa. However, no differences were found on the diversity of bacteria between cultivars. Overall the results indicated that microbial abundance and diversity in

olives is influenced by the plant host. In fact, all the olive trees analyzed in this study co-exist in the same habitat but their olives harbored different microbial species. The relationship between plant characteristics at cultivar level (and their underlying genotypes) and developing phyllosphere microbial populations has been previously observed (Balint-Kurti et al. 2010; Hunter et al., 2010). For instances, the phyllosphere bacterial population, both epiphytic and endophytic, assessed on a set of lettuce plants was found to be influenced by physical, chemical and physiological plant properties (Hunter et al., 2010). Therefore, the differences in the species composition of endophytes and epiphytes recovered from different olive tree cultivars might be a reflection of plant host preference of individual taxa. Olives of the cultivars analyzed differed in their chemical composition which could account for these differences. For instances, the contents of hydroxytyrosol, an important polyphenolic compound with antimicrobial activity, on olives of the cv. Verdeal Transmontana, Cobrançosa and Madural is in average 558.50 mg/Kg, 1439.8 mg/Kg and 44684 mg/Kg, respectively (Vinha et al., 2002).

Cluster analyses of microbial endophyte and epiphyte community based on Jaccard's and Bray-Curtis similarity presented in two-dimensional NMDS plots corroborate the differences found on endophytic and epiphytic assemblage between olive tree cultivars (Figure 1). In this analysis was observed that, in general, the microorganisms clustered according to the cultivar from which has been isolated. ANOSIM test confirmed that microorganism composition among cultivars were different with statistical significance (Table 3). Similarity percentages (SIMPER) analyses, based on mean abundance estimates, showed that among epiphytic community, taxa sp. 6, *Davidiella tassiana* and *Chromelosporium carneum*, were contributing most to the difference found between olive tree cultivars; whereas in endophytic community and in the whole microbial community (endophyte + epiphyte) was the specie sp. 6 (Figures 2-4).

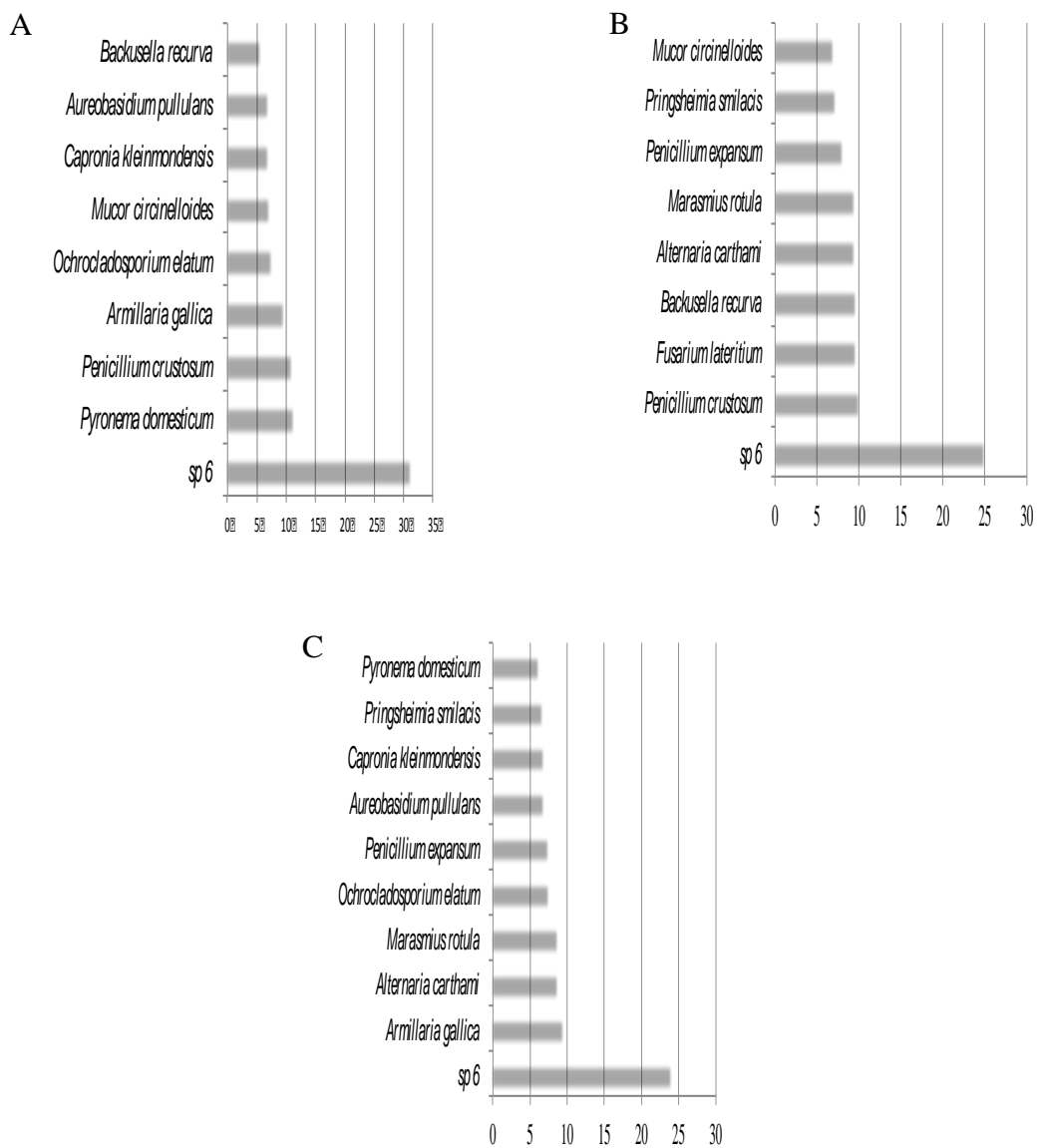
The separation of microbial communities is mainly due to the presence of both dominant and exclusively species in each cultivar (Figure 5). As depicted in figure 5 the number of common species between olive tree cultivars is low, in both endophytic and epiphytic community.



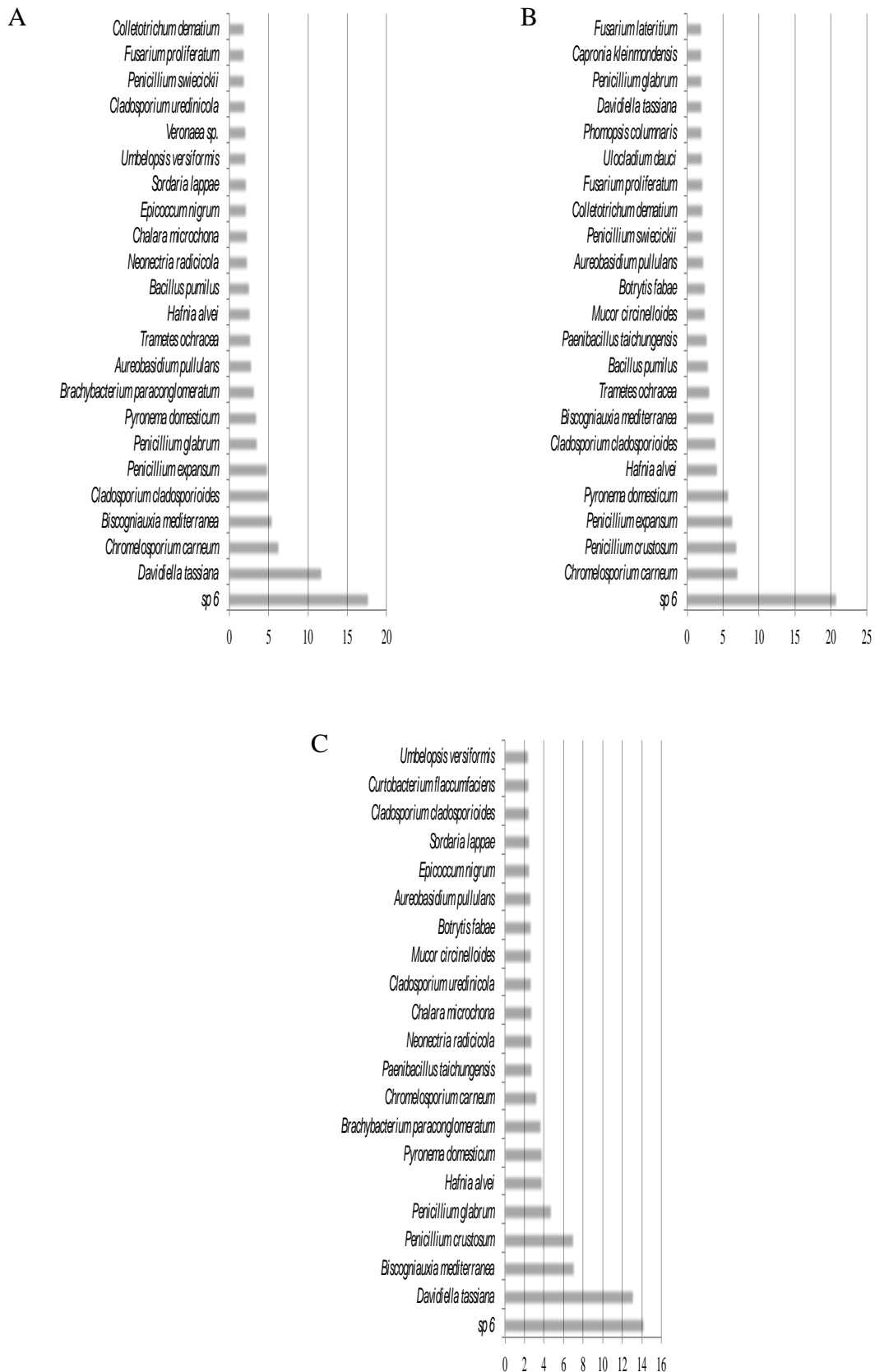
**Figure 1** - Non-metric multidimensional scale (NMDS) plots corresponding to the clustering of microorganisms communities (endophytic, epiphytic and total) grouped by cultivar (Madural, Verdeal Transmontana and Cobrançosa). Clustering analysis was performed with two different community similarity measures, namely Jaccard's index and Bray-Curtis coefficient. Kruskal's stress values inferior to 0.2 represent good ordination plots.

**Table 3** - Results of ANOSIM (Analysis of Similarity) tests showing the R statistic and P levels of global model and pairwise comparisons of microorganism community (epiphytic, endophytic and total) among olive tree cultivars (Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana).

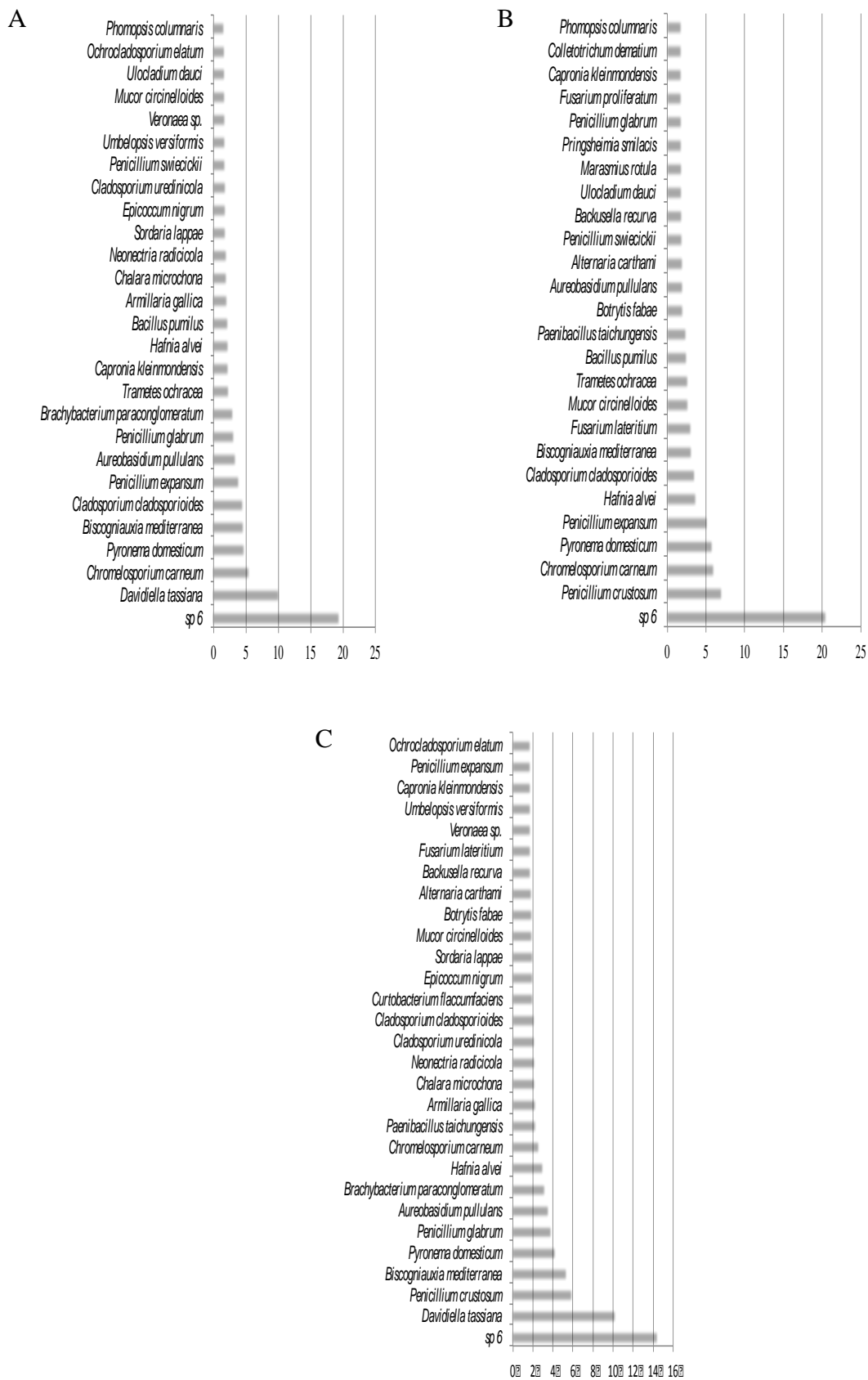
<b>Global Test</b>	<b>Pairwise Tests</b>	<b>R Statistic</b>	<b>P level</b>
<b>Epiphytic microorganisms</b>			
Sample statistic (Global R): 0.24	Cobrançosa x Madural	0.39	0.0010
Significance level of sample statistic: 0.0010	Cobrançosa x Verdeal	0.11	0.077
Number of permutations: 1000	Madural x Verdeal	0.27	0.0070
<b>Endophytic microorganisms</b>			
Sample statistic (Global R): 0.23	Cobrançosa x Madural	0.44	0.0050
Significance level of sample statistic: 0.0070	Cobrançosa x Verdeal	0.28	0.0020
Number of permutations: 1000	Madural x Verdeal	0.23	0.019
<b>Total microorganisms</b>			
Sample statistic (Global R): 0.21	Cobrançosa x Madural	0.32	0.0020
Significance level of sample statistic: 0.0010	Cobrançosa x Verdeal	0.081	0.12
Number of permutations: 1000	Madural x Verdeal	0.26	0.019



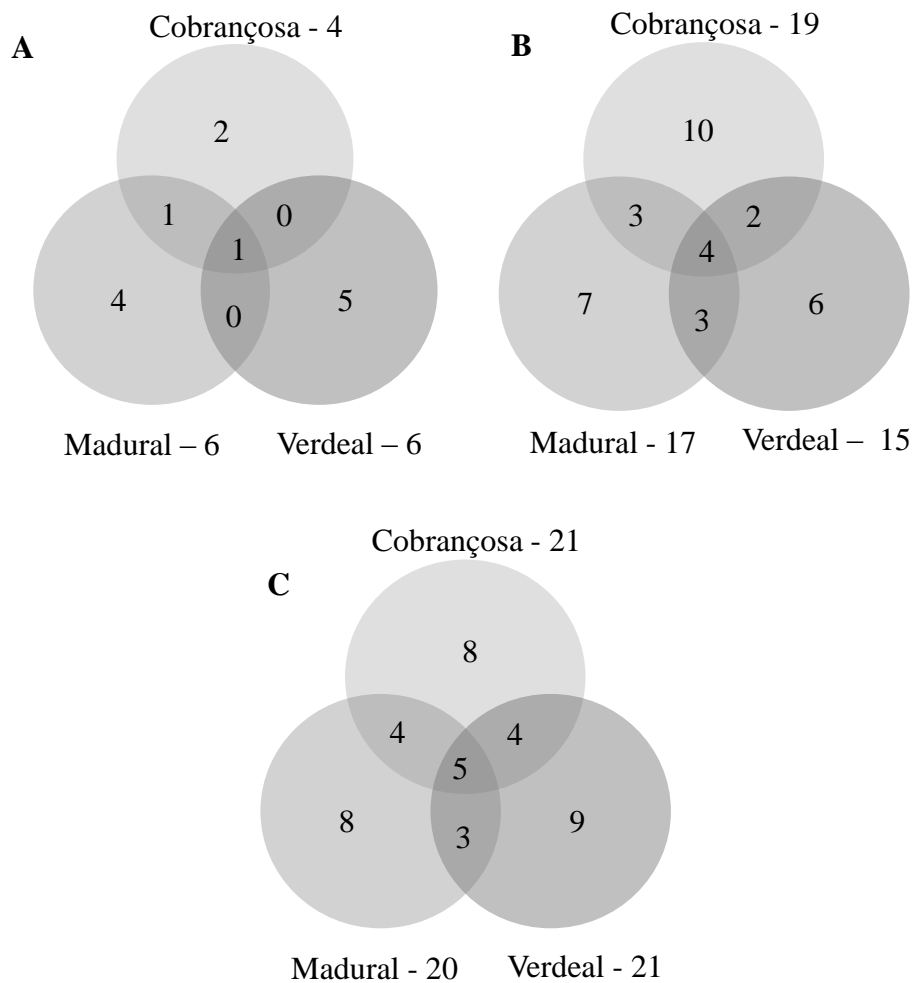
**Figure 2** – SIMPER (Similarity Percentage) of the endophytic microorganisms among olive tree cultivars pairwise (A: Cobrançosa x Madural; B: Cobrançosa x Verdeal Transmontana; C: Madural x Verdeal Transmontana).



**Figure 3** – SIMPER (Similarity Percentage) of the epiphytic microorganisms among olive tree cultivars pairwise (A: Cobrançosa x Madural; B: Cobrançosa x Verdeal Transmontana; C: Madural x Verdeal Transmontana).



**Figure 4** – SIMPER (Similarity Percentage) of the total endo- and epiphytic microorganisms among olive tree cultivars pairwise (A: Cobrançosa x Madural; B: Cobrançosa x Verdeal Transmontana; C: Madural x Verdeal Transmontana).



**Figure 5** - Venn diagrams representing the total number of endophytic (A), epiphytic (B) and total (C) species shared between the olive tree cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana (Verdeal).

## Conclusion

The results presented in this work shows that the olive of each cultivar have specific epi and endophytic microbial community. The dissimilarity of bacterial and fungal communities between Verdeal Transmontana, Cobrançosa and Madural suggests an effect of plant cultivar on the associated phyllosphere microbial assemblages. Both bacterial and fungal communities were also found to differ in size and in composition between the surface and the interior tissues of olives. These variations could be caused by differences in the physical and nutritional onditions

characteristic of the two habitats. For a better understanding of the diversity of the endophytes and epiphytes community associated to olives and their practical implication, in special on plant protection, it is recommended to performed further studies addressing this topic by sampling a larger number of trees and combined cultivation and culture-independent techniques.

## References

- Alvindia, D.G., and Natsuaki, K.N. (2008). Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*. 27: 1200–1207.
- Andrews, J.H., and Harris, R.F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 145-80.
- Hermoso, M., Uceda, M., García, A., Morales, B., Frías, M., and Fernández, A. (1991) Elaboracion de aceite de calidad. Consejeria de Agricultura y Pesca, Serie Apuntes, 5/92, Sevilla.
- Angerosa, F., Lanza, B., and Marsillio, V. (1996). Biogenesis of the “fusty” defect in virgin olive oils. *Grasas y Aceites*. 47: 142–150.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., and Kursar, T.A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*. 3(4): 267–274.
- Balint-Kurti, P., Simmons, S.J., Blum, J.E., Ballarré, C.L., and Stapleton, A.E. (2010). Maize leaf epiphytic bacteria diversity patterns are genetically correlated with resistance to fungal pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23: 473–484.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*. 12(9): 2385-2397.
- Bodenhausen, N., Horton, M.W., and Bergelson, J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 8: e56329.
- Bray, J.R., and Curtis, J.T. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographies*. 27:325-349.
- Byrne, J. M., Dianese, A. C., Ji, P., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Louws, F. J., Miller, S. A., Jones, J. B., Wilson, M. (2005) Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control*, 32: 408–418.

- Cai, L., Ye, L., Tong, A.H.Y., Lok, S., Zhang, T. (2013). Biased Diversity Metrics Revealed by Bacterial 16S Pyrotags Derived from Different Primer Sets. *PLoS One*. 8(1): e53649.
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M. R., Altieri, C., and Sinigaglia, M. (2005). Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles. *Food Technology and Biotechnology*. 43: 289–294.
- Clarke, J. (1993). Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*. 18:117–143.
- Clarke, K.R. and Gorley, R.N. (2001). *Primer v5: user manual/tutorial*. PRIMER-E, Plymouth
- Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria Edited by Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A. (1993). Cambridge University Press. Third edition.
- Crous, P.W., Verkley, J.Z., Groenewald and Samson, R.A. (2009). *Fungal Biodiversity*. CBS Laboratory Manual Series.
- Dugan, F.M., Roberts G. (1994): Etiology of preharvest colonization of Bing cherry fruit by fungi. *Phytopatology*. 84: 1031–1036.
- Elvira-Recuenco, M., and van Vuurde, J.W.L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:1036-1041.
- Fakas, S., Kefalogianni, I., Makri, A., Tsoumpeli, G. Rouni, G., Gardeli, C., Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2010). Characterization of olive fruit microflora and its effect on olive oil volatile compounds biogenesis. *European Journal Lipid Science and Technology*. 112: 1024–1032.
- Finkel, O.M., Burch, A.Y., Lindow, S.E., Post, A.F. and Belkin, S. (2011). Geographical location determines the population structure in phyllosphere microbial communities of a salt-excreting desert tree. *Applied Environmental Microbiology*. 77: 7647–7655.
- Fisher, P. J. and Petrini, O., Petrini, L. E. and Descals, E. (1992). A preliminary study of fungi inhabiting xylem and whole stems of *Olea europea*. *Sydowia*. 44: 117–121.

- Gerlach, W., and Nirenberg, H.I. (1982). The Genus *Fusarium*—A pictorial atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirsch. Berlin-Dahlem. 209: 1-406.
- Guimarães, J.B., Chambel, L., Melzoch, K., Pereira, P., Tenreiro, R. (2011). *Cladosporium* sp. from phyloplane: a diversity evaluation on a continental ecosystem. *Mycosphere* 2:191–201.
- Hakizimana, J.D., Gryzenhout, M., Coutinho, T.A., and Berg, N. (2011). Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings VII World Avocado Congress 2011 (Actas VII Congreso Mundial del Aguacate 2011). Cairns, Australia.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., Song, W. (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 66–76.
- He, Y.H., Isono, S. Shibuya, M., Tsuji, M., Purushothama, C.R.A., Tanaka, K., and Sano, T. (2012). Oligo-DNA custom macroarray for monitoring major pathogenic and nonpathogenic fungi and bacteria in the phyllosphere of apple trees.” *PLoS One*. 7(3): e34249. doi:10.1371/journal.pone.0034249.
- Henderson, P.A. and Seaby, R.M.H. (2007). Community Analysis Package 4.0 Pisces Conservation Ltd, Lymington, UK.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (1983). Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Reviews Phytopathology*. 21:243-269.
- Hunter, P.J., Hand P., Pink D., Whipps J.M., and Bending, G.D. (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*. 76: 8117–8125.
- Hyde, K.D., and Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*. 33: 163 – 173.
- Ivanova, E.G., Doronina, N.V., Shepelyakovskaya, A.O., Laman, A.G., Brovko, F.A., and Trotsenko, Y.A. (2000) Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiology*. 69:646-651.

- Kayini, A., and Pandey, R.R. (2010). Phyllosphere Fungi of *Alnus nepalensis*, *Castanopsis hystrix* and *Schima walichii* in a Subtropical Forest of North East India. *Journal of American Science*. 6(3):118-124.
- Krishnan, P.1., Bhat, R., Kush, A., Ravikumar, P. (2012). Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits. *Journal of Applied Microbiology*. 113(2): 308-17.
- Kruskal, J. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*. 29: 1–27.
- Lanciotti, R., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., and Guerzoni, M. E., (1999). Microbial characterization of table olives from the Apulian market. *Advances in Food Sciences*. 21: 159–165.
- Legault D, Dessureault M, Laflamme G. (1989). Mycoflora of the needles of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa*. 1. Endophytic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 67: 2052–60.
- Leveau, J.H.J. (2015). Life of Microbes on Aerial Plant Parts. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Lugtenberg B. (eds). Springer International Publishing. 17-24.
- Linaldeddu, B.T., Sirca, C., Spano, D., Franceschini, A. (2011). Variation of endophytic cork oak-associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *Forest Pathol*, 41: 193–201.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 1875–1883.
- Magurran, A.E. (2004). *Measuring biological diversity*. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Malavolta, C., and Perdakis, D. (2012). Guidelines for integrated production of olives. *IOBC Technical Guideline III*. 77: 1–19.
- Mendoza, A.R. and Sikora, R.A. (2009). Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl*. 54: 263-272.
- Miguel, P.S.B, Delvaux, J.C., de Oliveira, M.N.V., Monteiro, L.C.P., Freitas, F.S., Costa, M.D., Tótola, M.R., de Moraes, C.A., and Borges, A.C. (2013). Diversity

- of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. African Journal of Microbiology Research. 7(7): 586-594.
- Monier, J.-M. and Lindow, S.E. (2004) Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. Applied and environmental microbiology. 70(1): 346–355.
- Moricca, S., Ginetti, B., and Ragazzi, A. (2012) Species and organ specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. Phytopathologia Mediterranea, 51: 587–598.
- Muller, T., and Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology FEMS Microbiology Ecology. 87: 2–17.
- Newton, A.C., Gravouil, C., and Fountaine, J.M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. Annals of Applied Biology. 157(3): 343-349.
- Oliveira, I., Pereira, J.A., Lino-Neto, T., Bento, A., and Baptista, P. (2012). Fungal diversity associated to the olive moth, *Prays oleae* Bernard: a survey for potential entomopathogenic fungi. Microbial Ecology. 63: 964-974.
- Omer, Z.S., Tombolini, R., Broberg, A., and Gerhardson, B. (2004). Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. Plant Growth Regulatio. 43:93-96.
- Osono, T. (2008). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. Mycologia. 100(3): 387–391.
- Osono, T. (2014). Diversity and ecology of endophytic and epiphytic fungi of tree leaves in Japan. In Verma, Vijay C., Gange, Alan C. (Eds.). Advances in Endophytic Research, Springer, India. 3-26.
- Osono, T. and Mori, A. (2004). Distribution of phyllosphere fungi within the canopy of giant dogwood. Mycoscience. 45: 161-168.
- Özaktan, H., Bora, T. (2004) Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain EH 24. Brazilian journal of Microbiology, 35: 224-229.
- Pereira, A.P., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules. 12: 1153–1162.

- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves (Andrews, J.H., Hirano, S.S., eds.). Microbial Ecology of Leaves. Springer, Berlin Heidelberg New York. 179–197.
- Porras-Alfaro A., Bayman, P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annual Review of. Phytopathology. 49: 291–315.
- Posada, F., and Vega, F.E. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Mycoscience. 47(5): 284–289.
- Prasad, M.P., and Dagar, S. (2014) Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. ISSN: 2319-7706. 3(8): 937-947.
- Rasche, F., Marco-Noales, E., Velvis, H., van Overbeek, L.S., Lopez, M.M., van Elsas, J.D., and Sessitsch, A. (2006). Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field grown conventional and genetically modified T4-lysozyme producing potatoes. Plant and Soil. 289:123-140.
- Rasche, F., Trondl, R., Naglreiter, C., Reichenauer, T.G. and Sessitsch, A. (2006). Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Canadian Journal of Microbiology. 52:1036-1045.
- Rasche, F., Velvis, H., Zachow, C., Berg, G., van Elsas, J.D., and Sessitsch, A. (2006). Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. Journal of Applied Ecology. 43:555-566.
- Rodriguez, R.J., White Jr, J.F, Arnold, A.E., and Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist. 182: 314–330.
- Romantschuk, M. (1992). Attachment of plant pathogenic bacteria to the surface of plants. Annual Review Phytopatolology. 30: 225–243.
- Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Santiago, I.F., and Rosa, C.A. (2010). Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. FEMS Microbiology Ecology. 73: 178–189.

- Santamaria J, and Bayman P. (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*. 50: 1–8.
- Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Schubert, K., Groenewald, J.Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C.F., Zalar, P., Hoog, G.S., and Crous, P.W. (2007). Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Annual Review of Phytopathology*. 58: 105–156.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K. and Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. 106: 996-1004.
- Seaby, R.M., and Henderson, P.A. (2006). *Species Diversity and Richness Version 4*. Lymington, UK: Pisces Conservation.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., and Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. 39:23-32.
- Sia, E.F., Marcon, J., Luvizotto, D.M., Quecine, M.C., Tsui, S., Pereira, J.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L. (2013). Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. *SpringerPlus*. 2:579
- Singh, P., Piotrowski, M., Kloppstech, K., Gau, A. E. (2004) Investigations on epiphytic living *Pseudomonas* species from *Mallus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environmental Microbiology*, 11: 1149-1158.
- Sun, X., Ding, Q., Hyde, K.D., Guo, L.D. (2012). Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology*. 5: 624-632.

- Verginer, M., Leitner, E., and Berg, G. (2010). Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:8344-8350.
- Viñas, I., Usall, I., Teixido, N., and Sanchis, V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. 40(1–2): 9–16.
- Vinha, A., Ferreres, F., Silva, B., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J., Oliveira, M., Sebra, R., and Andrade, P. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*. 89:561–568.
- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 828-840.
- Wang, X., Li, G., Jiang, D., and Huang, H.C. (2009). Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biological Control*. 50(2): 164-171.
- Warriner K, Huber A, Namvar A, Fan W, Dunfield K. (2009). Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Advances in Food and Nutrition Research*. 57: 155–208
- Weisstein, E.W. (2013). “Prolate Spheroid.” From MathWorld - A Wolfram Web Resource. Available at: <http://mathworld.wolfram.com/ProlateSpheroid.html> [accessed november 30, 2014].
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink D.A.C., and Bending, G.D. (2008). Human pathogens and the phyllosphere. *Advances in Applied Microbiology*. 64:183-221.
- Whipps, M., Hand, P., Pink, D., and Bending, G.D. (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 1744–1755.
- White, J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., and White, T. J. (ed) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Yadav, R.K.P., Karamanoli, K, and Vokou, D. (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbiology Ecology*. 50:185–196.

## Supporting information

**Table S1** – Fungal and bacteria taxa isolated in this study and the summary of BLAST results, showing the coverage of the sequences and sequence similarities with the most closely related organisms.

Isolated (GenBank Acc. no. of the ITS sequence)	Query coverage	Sequence similarity	E-value*	Organism with the highest sequence identity, GenBank Acc. no.
<i>Alternaria carthami</i> (submitted)	99%	100%	0.0	KC702781
<i>Aphanocladium album</i> (submitted)	83%	100%	0.0	KC008970
<i>Armillaria gallica</i> (submitted)	98%	99%	0.0	JN657458
<i>Aureobasidium pullulans</i> (submitted)	100%	100%	0.0	KM030325
<i>Bacillus pumilus</i> (submitted)	100%	99%	0.0	KC122360
<i>Backusella recurva</i> (submitted)	100%	100%	0.0	JX644552
<i>Biscogniauxia mediterranea</i> (submitted)	97%	100%	0.0	JF295128
<i>Botrytis fabae</i> (submitted)	97%	99%	0.0	EU821471
<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> (submitted)	98%	98%	0.0	HF585270
<i>Capronia sp.**</i> (submitted)	96%	93%	0.0	EU552107
<i>Chalara microchona</i> (submitted)	98%	99%	0.0	HM036588
<i>Chromelosporium carneum</i> (submitted)	97%	99%	0.0	FJ791148
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (submitted)	97%	99%	0.0	HM776418
<i>Cladosporium cucumerinum</i> (submitted)	99%	99%	0.0	DQ681347
<i>Cladosporium uredinicola</i> (submitted)	88%	99%	0.0	KC876518
<i>Colletotrichum dematium</i> (submitted)	87%	99%	0.0	JN998107
<i>Coprinellus xanthothrix</i> (submitted)	100%	100%	0.0	HF543673
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (submitted)	99%	100%	0.0	KJ529042
<i>Davidiella tassiana</i>	99%	99%	0.0	JN986782

(submitted)				
<i>Epicoccum nigrum</i>	94%	99%	0.0	KM078045
(submitted)				
<i>Fusarium lateritium</i>	100%	100%	0.0	JQ693397
(submitted)				
<i>Fusarium proliferatum</i>	78%	99%	0.0	GQ924905
(submitted)				
<i>Hafnia alvei</i>	84%	98%	0.0	KC210858
(submitted)				
<i>Inonotus hispidus</i>	93%	99%	0.0	JX501315
(submitted)				
<i>Marasmius rotula</i>	100%	100%	0.0	JN943598
(submitted)				
<i>Mucor sp.**</i>	100%	94%	1,00E-63	FN663960
(submitted)				
<i>Neonectria sp.**</i>	91%	93%	4,00E-79	HQ889725
(submitted)				
<i>Ochrocladosporium sp.**</i>	98%	94%	5,00E-180	EU040233
(submitted)				
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	100%	99%	0.0	HQ224631
(submitted)				
<i>Penicillium crustosum</i>	100%	100%	0.0	KJ728702
(submitted)				
<i>Penicillium expansum</i>	100%	100%	0.0	KC894714
(submitted)				
<i>Penicillium glabrum</i>	100%	99%	0.0	HM776431
(submitted)				
<i>Penicillium swiecickii</i>	99%	99%	0.0	NR_121254
(submitted)				
<i>Phomopsis columnaris</i>	84%	96%	1,00E-94	KF887084
(submitted)				
<i>Pringsheimia smilacis</i>	92%	98%	0.0	AJ244257
(submitted)				
<i>Pyronema domesticum</i>	100%	99%	0.0	HM016895
(submitted)				
<i>Sordaria lappae</i>	97%	99%	0.0	AY681171
(submitted)				
<i>Trametes sp.**</i>	100%	94%	0.0	EU661884
(submitted)				
<i>Ulocladium dauci</i>	100%	100%	0.0	EU330456
(submitted)				
<i>Umbelopsis versiformis</i>	100%	99%	0.0	KC489496
(submitted)				

\*BLAST expected value represents the number of sequence matches expected by random chance (the smaller the value, the better the match to the reported NCBI database sequence)

\*\* Labelled as unknown (Sequence similarity <95%)

# Capítulo 4

**Conclusão**



## Conclusão

A cultura da oliveira apresenta uma enorme importância económica para os países mediterrânicos, incluindo Portugal. O estudo da comunidade microbiana epifítica e endofítica associada ao fruto da oliveira, apresenta elevado interesse ao nível agrícola e alimentar. A identificação e a exploração de microrganismos antagonistas de fitopatogénicos ou de agentes de luta biológica contra pragas da oliveira ao nível da comunidade microbiana natural presente na azeitona poderá ser bastante útil para o desenvolvimento de biopesticidas. Adicionalmente, a população microbiana existente na azeitona poderá ser explorada no sentido de contribuir para a obtenção de produtos diferenciados do olival. Neste âmbito destacam-se, por exemplo, microrganismos que através dos seus metabolitos secundários permitam uma melhoria do aroma, sabor e qualidade dos produtos do olival, ou ainda para o desenvolvimento de produtos funcionais (probióticos). Tanto quanto se sabe, a comunidade microbiana presente em azeitonas frescas foi muito pouco estudada, inclusive para as cultivares Portuguesas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a flora microbiana natural (bactérias e fungos) presente na superfície (comunidade epifítica) e no interior (comunidade endofítica) de azeitonas de três cultivares Portuguesas, Madural, Verdeal Transmontana e Madural.

A comunidade microbiana associada à azeitona das três cultivares demonstrou ser muito abundante e diversa, obtendo-se um total de 270 isolados (122 bactérias e 151 fungos filamentosos) pertencentes a 41 taxa (6 bactéria e 35 fungos filamentosos). Os fungos, identificados molecularmente através da sequenciação da região ITS do DNA ribossomal, pertenciam a 24 géneros e 19 famílias, sendo *Davidiella tassiana* a espécie mais abundante. Por sua vez, as bactérias, identificadas molecularmente pela sequenciação da região 16S do DNA ribossomal, pertenciam a 5 géneros e a 5 famílias. Neste grupo, a espécie mais abundante foi designada por sp. 6 pelo facto da sua sequência 16S não se encontrar especificada na base de dados GenBank.

A comparação das duas comunidades endofíticas e epifíticas das azeitonas permitiu evidenciar diferenças ao nível da diversidade e riqueza de espécies. Nas três cultivares de oliveira verificou-se que a comunidade epifítica era mais diversa (um total 35 taxa) e abundante (um total de 227 isolados) face à comunidade endofítica

(um total de 13 taxa e 43 isolados). Este resultado foi corroborado pelo cálculo dos índices de diversidade Simpson e de Shannon-Wiener. Adicionalmente verificou-se que a composição microbiana das duas comunidades, endofítica e epifítica, diferia. Na comunidade endofítica as espécies mais abundantes correspondiam à bactéria sp. 6 e aos fungos *Pyronema domesticum* e *Fusarium lateritium*, representando o seu conjunto 53,48% do total de isolados nesta comunidade. Por sua vez, ao nível da comunidade epifítica, verificou-se a predominância da bactéria sp. 6, e dos fungos *Davidiella tassiana* e *Penicillium expansum*, representando as três espécies 54,36% do total dos isolados nesta comunidade. A reduzida similaridade em termos de composição microbiana das duas comunidades foi corroborada pelo baixo valor de Sørensen's calculado (0,26).

A comparação da comunidade microbiana entre as três cultivares de oliveira também revelou diferenças em termos de diversidade e abundância. A comunidade fúngica endofítica foi mais diversa e abundante na cv. Verdeal Transmontana (5 taxa, 12 isolados) e Madural (5 taxa, 10 isolados) face à cv. Cobrançosa (3 taxa, 6 isolados). A comunidade fúngica endofítica da cv. Cobrançosa foi dominada pelas espécies *Penicillium crustosum* e *P. domesticum*, enquanto que na cv. Verdeal Transmontana foi pela espécie *F. lateritium* e na cv. Madural pelas espécies *Aureobasidium pullulans*, *Armillaria gallica* e *P. domesticum*. Nesta comunidade endofítica foi identificada apenas a presença de uma espécie bacteriana, sp. 6, que mostrou ser mais abundante na cv. Cobrançosa (7), seguida pelas cultivares Madural (5) e Verdeal Transmontana (3). A taxa de colonização por fungos endofíticos foi superior nas azeitonas da cv. Verdeal Transmontana e Madural (17% cada), enquanto que a colonização por bactérias (sp. 6) foi superior nas azeitonas da cv. Cobrançosa (10%) e Madural (8%).

Ao nível da comunidade epifítica, verificou-se que a diversidade e abundância de fungos foi superior nas azeitonas da cv. Cobrançosa (16 taxa, 32,68 ufc/cm<sup>2</sup>) e Madural (13 taxa, 32,88 ufc/cm<sup>2</sup>) do que na cv. Verdeal Transmontana (11 taxa, 12,95 ufc/cm<sup>2</sup>). Os fungos mais abundantes nas cultivares Cobrançosa, Verdeal Transmontana e Madural foram, respectivamente, *P. expansum*, *P. crustosum* e *D. tassiana*. Quanto às bactérias epifíticas, verificou-se uma maior abundância nas azeitonas das cultivares Madural (23,95 ufc/cm<sup>2</sup>) e Verdeal Transmontana (20,96 ufc/cm<sup>2</sup>).

Os resultados obtidos evidenciam, pela primeira vez, a abundância e a diversidade de fungos e bactérias endo- e epifíticas presentes na azeitona. Algumas das espécies identificadas encontram-se já descritas como tendo um papel na luta biológica (*C. flaccumfaciens*) ou como produtores de compostos voláteis (*D. tassiana*), o que vem abrir novas perspectivas para a sua exploração. É contudo ainda necessário proceder-se a um estudo mais detalhado desta comunidade microbiana, alargando o número de plantas amostradas.