



**Contributo para a elucidação de uma podridão da azeitona e do seu
potencial agente causal**

Adrielle Luisa de Jesus Itaparica

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de
Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia
no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Federal
do Recôncavo da Bahia.*

Orientado por:

Paula Cristina dos Santos Baptista

Maria Gardenny Ribeiro Pimenta

**Bragança
2021**

*“A melhor maneira encontrada pelo homem
para se aperfeiçoar é aproximando-se de Deus”*

Pitágoras.

RESUMO

O olival é uma cultura que, a nível nacional, apresenta uma grande importância económica, social e paisagística. Associado a esta cultura existem várias doenças que afetam tanto a parte radicular como a parte aérea, provocando elevados prejuízos ao nível da produção. Nos últimos anos tem surgido nalguns olivais Transmontanos, situados na região de Mirandela, frutos apodrecidos com uma sintomatologia ainda não descrita na literatura. Trabalhos anteriores permitiram obter vários isolados fúngicos de uma mesma morfoespécie que se encontravam presentes na maioria das azeitonas que apresentavam estas lesões. Assim, este estudo pretende identificar molecularmente o microrganismo que poderá estar associado ao desenvolvimento desta podridão, confirmar a sua patogenicidade e finalmente avaliar o efeito de espécies endófitas do fruto (*Kocuria* sp. e *Vishniacozyma cf. victoriae*) no processo de patogenicidade. A sequenciação da região ITS do DNAr dos isolados previamente obtidos de frutos apodrecidos permitiu a identificação do fungo *Neocosmospora aff. solani*. A aplicação dos postulados de Kock em ensaios laboratoriais (em azeitonas) ou de campo (em ramos de oliveira) permitiu identificar *N. solani* como sendo o potencial agente causal da podridão nas azeitonas. A presença *Kocuria* sp. revelou ainda cooperar com *N. solani* no desenvolvimento da podridão, aumentando a sua incidência e severidade, bem como a germinação e esporulação de *N. solani*. Pelo contrário, em ensaios de campo, *V. victoriae* demonstrou ter um efeito inibitório no desenvolvimento da podridão. Estes resultados, apesar de preliminares, constituem um primeiro contributo para a caracterização desta nova podridão dos frutos que recentemente tem vindo a causar enorme preocupação entre os olivicultores, devido ao aumento da sua incidência.

Palavras-chave: Oliveira, doença, *Neocosmospora solani*, *Kocuria*, *Vishniacozyma victoriae*, interação patogénico-microrganismo.

ABSTRACT

The olive crop has, at national level, great economic, social and landscape importance. Associated with this crop there are several diseases that affect both the root and the aerial part of the tree, causing high losses in terms of production. In recent years, some olive groves located in Mirandela region (Northeast of Portugal), have been showed an increase in incidence of rotten fruits with symptoms that have not yet been described in the literature. Previous studies allowed the isolation of several fungal isolates of the same morphospecies that were present in most of the rotten olives collected in these orchards. Thus, this study aims to molecularly identify the microorganism that may be associated with the development of this rot, confirm its pathogenicity and finally evaluate the effect of endophytic species of the fruit (*Kocuria* sp. And *Vishniacozyma cf. victoriae*) on the pathogenic process. The sequencing of the ITS region of the DNAr of the isolates previously obtained from rotting fruits allowed the identification of the fungus *Neocosmospora aff. solani*. The application of Kock's postulates in laboratory (in olives) or field (in olive branches) assays allowed the identification of *N. solani* as being the potential causal agent of rot in olives. *Kocuria* sp. also revealed to cooperate with *N. solani* in the development of rot, increasing its incidence and severity, as well as the germination and sporulation of *N. solani*. In contrast, in field assays, *V. victoriae* showed to displayed an inhibitory effect on the development of the rot. These results, although preliminary, are the first contribution to the characterization of this new fruit rot that has recently caused enormous concern among olive growers, due to the increase in its incidence.

Keywords: Olive tree, disease, *Neocosmospora solani*, *Kocuria*, *Vishniacozyma victoriae*, pathogen-microorganism interaction

Agradecimentos

Foi um caminho longo para poder realizar esse sonho e gostaria de demonstrar meus sinceros agradecimentos a todos os participantes dessa conquista. Primeiro às minhas orientadoras, Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista da Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e a Professora Doutora Maria Gardenny Ribeiro Pimenta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela orientação científica, pela dedicação e todos os comentários que me ajudaram a concluir mais essa etapa.

A todos envolvidos no programa de dupla titulação entre a UFRB e o IPB por possibilitar essa experiência imensurável.

A minha mãe, meus amigos pelo apoio emocional, infinita paciência e por segurarem minha mão diante das diversas situações enfrentadas nesse período difícil, e por serem pessoas maravilhosas e sempre assertivas.

Muito obrigado por contribuírem para a realização desse sonho.

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-031133 “MicOLives - Exploiting plant induced resistance by beneficial fungi as a new sustainable approach to olive crop protection”. Parte do trabalho foi adicionalmente financiado pelo centro de Investigação de Montanha - CIMO (UID/AGR/00690/2019) através do FEDER sob PT2020.



Sumário

1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	xii
2. INTRODUÇÃO	13
2.1. A cultura da oliveira: Importância económica	13
2.2. Principais doenças do olival	14
2.2.1. Doenças fúngicas da parte aérea	16
2.2.2. Doenças fúngicas da parte radicular	22
2.2.3. Doenças bacterianas da parte aérea.....	25
2.3. Principais doenças na região de Trás-os-Montes	27
2.4. Interações entre espécies no desenvolvimento de doenças	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Microrganismos em estudo	29
3.2. Caracterização morfológica e molecular do potencial agente causal.....	29
3.3. Preparação das suspensões de esporos/células (inóculos)	31
3.4. Avaliação da patogenicidade do isolado F1 e da influência de outros microorganismos colonizadores da Oliveira.....	31
3.4.1. Ensaio em laboratório	32
3.4.2. Ensaio em condições de campo	33
3.4.3. Parâmetros avaliados	34
3.5. Análise estatística	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1. Caracterização morfológica e molecular do potencial agente causal.....	36
4.2. Avaliação da patogenicidade de <i>Neocosmospora aff. solani</i>	38
4.3. Influência de outros microorganismos colonizadores da azeitona na patogenicidade de <i>N. solani</i>	41
4.3.1. Resultados dos ensaios em laboratório (em azeitonas).....	41
4.3.2. Resultados dos ensaios em campo	44
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	49
6. REFERÊNCIAS	50

Lista de Figuras

- Figura 1:** Produção mundial de azeitona na campanha 2018/2019 (Fonte: IOC, 2019). 14
- Figura 2:** Sintomatologia do olho de pavão. (a) Desfolhação da árvore e (b) manchas circulares de diferentes tonalidades na página superior das folhas. Fonte: Paula Baptista (IPB-CIMO). 16
- Figura 3:** Sintomas típicos da gafa da oliveira. (a) Aparecimento na superfície da azeitona de uma massa alaranjada de conídios em manchas necróticas deprimidas; (b) em condições de secura, os frutos infetados desidratam e mumificam; (c) as folhas infetadas podem cair causando a desfolhação da árvore. Fonte: Paula Baptista (IPB-CIMO). 18
- Figura 4:** Sintomas típicos da cercosporiose. (a) Manchas amareladas na parte superior das folhas que se tornam necróticas com o passar do tempo; (b) manchas acinzentadas na página inferior das folhas; (c) lesões deprimidas mais ou menos circulares e de coloração acastanhada nos frutos. Fonte: Ávila et al., 2020 (figuras a e b); Paula Baptista (IPB-CIMO) (figura c)....20
- Figura 5:** Sintomas típicos de diversas doenças fúngicas que afetam a parte aérea da oliveira. (a) Fumagina; (b) Escudete; (c) Lepra; (c) Várias podridões associadas à azeitona. Fonte: Paula Baptista (IPB-CIMO). 22
- Figura 6:** Sintomas típicos da verticilose. (a) Apoplexia onde se observa a rápida e extensa morte de ramos, sustentando as folhas amareladas; Sintomas do declínio lento com (b) desfoliação das folhas verdes, (c) necrose das inflorescências e (d) mumificação dos frutos. Fonte: López-Escudero & Mercado-Blanco (2011). 24
- Figura 7:** Sintomas típicos da tuberculose. (a) seca e quebra dos ramos; (b) formação de tumores que surgem nos rebentos e ramos jovens; (c) deformação dos frutos e formação de tumores nos pedúnculos, em infeções graves. Fonte: Paula Baptista (IPB - CIMO). 26
- Figura 8:** Sintomas típicos síndrome do declínio rápido da oliveira causados por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. (a) Sintomatologia nas folhas; (b) secagem de ramos na zona apical da copa; (c) Árvore com estrutura similar a um esqueleto, com emissão de rebentos a partir da base do tronco. Fonte: José Alberto Pereira (IPB-CIMO). 27

Figura 9: Azeitonas divididas por tratamento para os ensaios em campo com *V. Victoriae*.....33

Figura 10: Características morfológicas macroscópicas (a) e microscópicas (b) do fungo associado à podridão na azeitona (fungo F1), após 10 dias de incubação a 20-25°C em meio PDA. (a) Visão superior da colônia fúngica, (b) Morfologia dos esporos (conídios)..... 36

Figura 11: Árvore de Máxima Verosimilhança (- ln L = 2339.08) para sequências de ITS que mostra a relação filogenética do isolado F1 (a negrito) com estirpes-tipo de espécies da família Nectriaceae. Em parênteses estão os sinónimos taxonómicos. A árvore está desenhada à escala, em que o comprimento dos ramos foi medido em termos de número de substituições por posição nucleotídica. São mostrados os números de acesso do GenBank das sequências. 38

Figura 12: Incidência (a) e severidade (b) da podridão da azeitona causada pelo fungo *Neocosmospora solani* em ensaios laboratoriais (Lab, azeitonas inoculadas) e de campo (Campo, ramos inoculados), ao fim de 30 dias de inoculação. A incidência é expressa em percentagem de frutos infetados e a severidade é expressa numa escala de 1 (frutos com menos de 25% da superfície afetada) até 5 (fruto completamente podre). Os valores representam a média (ponto central) e desvio padrão (barras). 39

Figura 13: Sintomatologia causada por *Neocosmospora solani* em azeitonas da cv. Cobrançosa40

Figura 14: Áreas sob a curva de progresso da doença (podridão da azeitona) em termos da sua incidência (a) e severidade (b) causada por *Neocosmospora solani* na presença de *Kocuria* sp. ou de *Vishniacozyma cf. victoriae*. Tratamentos: *Kocuria* sp. ou *V. victoriae*- azeitonas inoculadas apenas com estas espécies endófitas; *N. solani*- azeitonas inoculadas apenas com o patogénico; *Kocuria* sp. ou *V. victoriae* 7d+*N. solani* - azeitonas inoculadas com um dos endófitos e após 7 dias inoculadas com *N. solani*; Controlo- azeitonas inoculadas apenas com meio LB (no caso do ensaio *Kocuria* sp.) ou com Tween (no caso do ensaio com *V. victoriae*). Valores médios registados para cada tratamento seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$, para cada dia analisado. 43

Figura 15: Boxplots, indicando a mediana, os quartis e os valores mínimo e máximo da germinação (a) e esporulação (b) de *Neocosmospora solani* no final do ensaio (30 dias após inoculação das azeitonas) no controlo positivo (*N. solani*) e na presença de *Kocuria* sp. ou de

Vishniacozyma cf. victoriae. Letras distintas nas barras de cada tratamento diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$ 44

Figura 16: Áreas sob a curva de progresso da doença (podridão da azeitona) em termos da sua incidência (a) e severidade (b) causada por *Neocosmospora solani* na presença de *Kocuria* sp. ou de *Vishniacozyma cf. victoriae*. Tratamentos: *Kocuria* sp. ou *V. victoriae*- ramos inoculados apenas com estas espécies endófitas; *N. solani*- ramos inoculados apenas com o patogénico; *Kocuria* sp. ou *V. victoriae* 7d+*N. solani* - ramos inoculados com um dos endófitos e após 7 dias inoculados com *N. solani*; Controlo- ramos inoculados apenas com meio LB (no caso do ensaio *Kocuria* sp.) ou com Tween (no caso do ensaio com *V. victoriae*). Valores médios registados para cada tratamento seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$, para cada dia analisado. 46

Figura 17: Boxplots, indicando a mediana, os quartis e os valores mínimo e máximo da germinação (a) e esporulação (b) de *Neocosmospora solani* no final do ensaio (52 dias após inoculação dos ramos) no controlo positivo (*N. solani*) e na presença de *Kocuria* sp. ou de *Vishniacozyma cf. victoriae*. Não se registaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ao nível de $p < 0,05$ 47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Doenças da oliveira, agentes causais e sua importância a nível mundial (Adaptado de Navero et al., 2017).....	15
--	----

1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

O olival é uma cultura que, no cenário nacional, apresenta uma grande importância económica, social e paisagística. Associado a esta cultura existem várias doenças que afetam tanto a parte radicular como a parte aérea, provocando elevados prejuízos a nível de produção. Na região de Trás-os-Montes, as principais doenças que afetam o olival são a tuberculose, causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, a gafa e o olho de pavão, causadas pelos fungos *Colletotrichum* spp. e *Venturia oleaginea*, respetivamente. No entanto, nos últimos anos tem-se vindo a observar um aumento do aparecimento de lesões em vários órgãos da oliveira em diversos olivais em Mirandela e, para os quais, não se tem informação. Nos frutos, em particular, têm-se vindo a observar um aumento da incidência de uma podridão com uma sintomatologia ainda não descrita na literatura. O isolamento em cultura de fungos a partir de azeitonas apresentando esta podridão, permitiu obter um conjunto de isolados de entre os quais foi identificado um potencial agente causal. Assim, neste trabalho pretende-se caracterizar esta podridão em azeitonas que poderá corresponder a uma potencial nova doença da oliveira. Especificamente pretende-se:

- 1- Identificar a espécie fúngica que previsivelmente será o agente causal desta podridão, quer por processos morfológicos como moleculares;
- 2- Provar a patogenicidade do fungo caracterizado com aplicação dos postulados de Koch, em ensaios de laboratório e de campo;
- 3- Avaliar a influência de outras espécies fúngicas vulgarmente presente em frutos na patogenicidade do agente causal.

Este estudo pretende ser um primeiro contributo para o conhecimento desta nova podridão das azeitonas, do seu agente causal e da influência de outras espécies microbianas naturalmente presentes nos frutos no desenvolvimento desta potencial doença.

O presente trabalho encontra-se organizado em quatro partes. Na primeira parte (Introdução) abordam-se aspetos relacionados com a importância da oliveira, em particular para Portugal, e dos principais constrangimentos à produção, dando-se especial ênfase às doenças. Na segunda parte (Material e Métodos) estão descritas as metodologias utilizadas na execução deste estudo e os métodos estatísticos aplicados. Na terceira parte (Resultados e Discussão) apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos e finalmente, na última parte (Conclusão), apresentam-se as principais conclusões do trabalho.

2. INTRODUÇÃO

2.1. A cultura da oliveira: Importância económica

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie cultivada principalmente para a produção de fruto (azeitona), sendo comercializado como ‘azeitona de mesa’ ou utilizado na produção de azeite (MALDONADO et al., 2016). A zona oriental da bacia mediterrânica (sul da Turquia, Síria, Líbano, Palestina e Israel) é aceite como o local de origem da oliveira (BESNARD et al., 2018). Foi a partir desta região que a oliveira se difundiu para outras localidades junto do mar Mediterrânico e, mais tarde, para outras regiões do mundo, tais como Perú, Chile, Uruguai, Argentina e regiões costeiras do México e Estados Unidos - Califórnia (IOC, 2019).

Na atualidade, a oliveira é também cultivada em países tradicionalmente não produtores como África do Sul, Austrália, Brasil, Nova Zelândia e China (CIMATO E ATTILIO, 2011; SU et al., 2018). Esta expansão tem vindo a contribuir para um aumento progressivo da área de olival mundial, atingindo em 2018 cerca de 10,6 Mha (FAO, 2019). No entanto, continua a ser na bacia mediterrânica onde se encontra a maior área de olival, tendo garantido esta região quase 95% da produção mundial na campanha de 2018/19 (Fig. 1; IOC, 2019). Cerca de 70% da produção mundial de azeitona provém da União Europeia (UE), enquanto que o Oriente e Norte de África garantem cerca de 24%, e os restantes 6% provêm de outros países do mundo, principalmente da Argentina, México, Peru e Estados Unidos (IOC, 2019). Na UE, Espanha é o maior produtor tendo garantido 39% da produção mundial na campanha 2019/20, seguido pela Itália (11%), Grécia (10%) e Portugal (4%) (IOC, 2020). A maior região de produção a nível nacional encontra-se no Alentejo, representando 50% do total da área olivícola, seguido de Trás-os-Montes (22%), Beira Interior (18%), Ribatejo (7,7%) e Algarve (2,3%) (IOC, 2019). O setor oleícola representa assim uma forte componente no setor agrícola nacional, representando 95,5 milhões de euros e 1,36% do valor da produção agrícola portuguesa (IOC, 2017).

A oliveira em Portugal tem também uma grande importância ao nível sociocultural e paisagístico, principalmente nas regiões do interior. O olival faz parte da paisagem e da identidade deste país e, a beleza desta paisagem, tem contribuído para o aumento do turismo associado ao sector do azeite (SANTOS, 2018). Para além de gerar benefícios adicionais para a economia, este aumento de turismo poderá contribuir para a fixação de pessoas nestas regiões do interior com problemas demográficos graves.

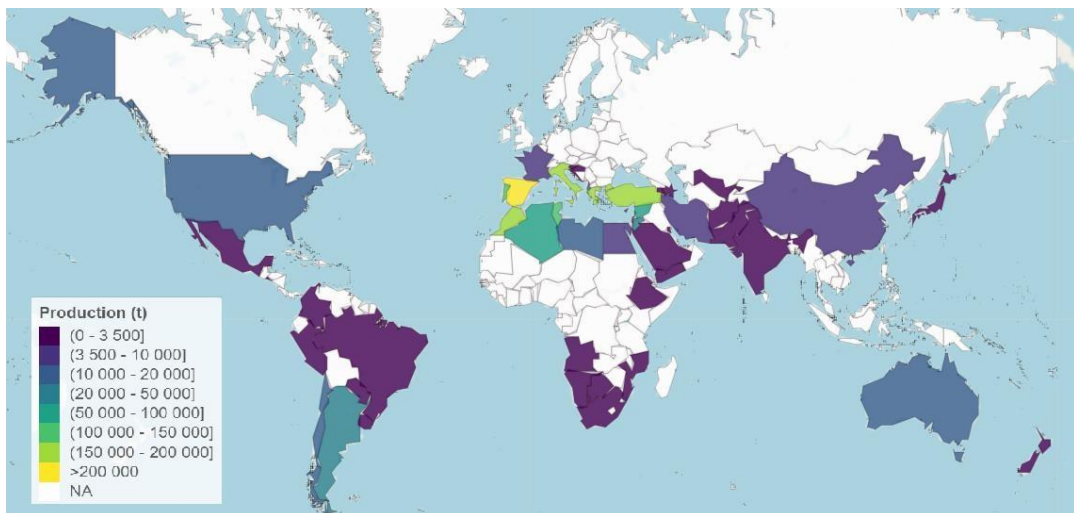


Figura 1: Produção mundial de azeitona na campanha 2018/2019 (Fonte: IOC, 2019).

2.2. Principais doenças do olival

A oliveira, tal como a maioria das outras culturas, está exposta a diversos fatores bióticos e abióticos que podem reduzir de forma direta ou indireta a produção e a qualidade dos seus produtos (azeite e azeitona de mesa). Na região mediterrânica, incluindo Portugal, as pragas e doenças são, dentre os fatores bióticos, os que mais prejuízos causam, podendo originar perdas de produção na ordem dos 30% (HANIOTAKIS, 2003). Estimativas recentes apontam para um agravamento deste cenário, devido ao efeito das alterações climáticas no favorecimento do desenvolvimento de pragas e doenças (PONTI et al., 2014). De entre as pragas, a traça da oliveira, *Prays oleae* (BERNARD, 1788) (Lepidoptera: Praydidae), e a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (ROSSI, 1790) (Diptera: Tephritidae), são as mais importantes no olival quer a nível mundial como nacional (NAVERO et al., 2017).

As doenças na oliveira são sobretudo causadas por fungos e bactérias e, com menor importância, por vírus, fitoplasmas e nemátodes (NAVERO et al., 2017). Na tabela 1 estão apresentadas as principais doenças que afetam a oliveira, e sua importância a nível mundial. De entre estas, as que mais prejuízos originam são causadas por fungos que afetam as folhas e frutos (em especial o olho de pavão, a gafa ou antracnose, e a cercosporiose) e o sistema radicular (verticilose e podridões radiculares), e finalmente as causadas por bactérias como a tuberculose-da-oliveira e mais recentemente o complexo da dessecação rápida da oliveira (NAVERO et al., 2017). Em seguida é feita uma descrição e caracterização das doenças da oliveira, de forma mais pormenorizada somente para as que apresentam maior importância a nível mundial e nacional.

Tabela 1: Doenças da oliveira, agentes causais e sua importância a nível mundial (Adaptado de NAVERO et al., 2017).

Parte afetada	Doença	Agente causal	Importância
Fúngicas			
Parte aérea	Olho de Pavão	<i>Venturia oleaginea</i> (= <i>Fusicladium oleagineum</i> = <i>Cycloconium oleagineum</i> = <i>Spilocaea oleaginea</i>)	E
	Gafa	<i>Colletotrichum</i> spp.	M
	Cercosporiose	<i>Pseudocercospora cladosporioides</i> (= <i>Cercospora cladosporioides</i>)	M
	Fumagina	<i>Capnodium elaeophilum</i>	B
	Escudete	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	B
	Lepra	<i>Neofabraea vagabunda</i> (= <i>Phlyctema vagabunda</i> = <i>Gloeosporium olivae</i>)	S
	Outras podridões do fruto	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Diplodia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phomopsis</i> , etc.	S
	Outras micoses foliares	<i>Leveillula</i> , <i>Phyllactinia</i> , <i>Marthamyces panizzei</i> (= <i>Stictis panizzei</i>), etc.	S
	Cancro de ramos	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i> , <i>Eutypa lata</i> , <i>Comoclathris incompta</i> (= <i>Phoma incompta</i>)	B
	Micoses do tronco	<i>Fomes</i> , <i>Fomitiporia</i> , <i>Phellinus</i> , <i>Polyprous</i> , <i>Stereum</i> , etc.	S
Parte radicular	Verticilose	<i>Verticillium dahliae</i>	E
	Podridão de raízes finas	<i>Phytophthora</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , etc.	M-B
	Podridão de raízes grossas	<i>Armillaria mellea</i> , <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>Omphalotus olearius</i>	B
Bacterianas			
Parte aérea	Tuberculose	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	E-M
	Síndrome do declínio rápido da oliveira	<i>Xylella fastidiosa</i>	E

Legenda: E – Elevada; M – Moderada; B – Baixa; S – Sem importância, apesar de ocasionalmente causarem estragos graves.

2.2.1. Doenças fúngicas da parte aérea

A doença **Olho de pavão**, causada pelo fungo *Venturia oleaginea*, é considerada uma das mais importantes e destrutivas do olival (VIRUEGA et al., 2013). Pode causar intensa desfolhação, enfraquecendo a planta e consequentemente reduzindo a produção de flores e interferindo na qualidade dos frutos. Os sintomas iniciais manifestam-se na parte superior das folhas pela formação de manchas circulares, com coloração variada, misturando tons de castanho, amarelado a verde, e de diâmetro também variável (Fig. 2). Na página inferior da folha aparecem manchas acinzentadas irregulares. Embora raramente, a sintomatologia desta doença pode também surgir no pedúnculo dos frutos pela formação de manchas escuras que, devido à interrupção da seiva, secam, provocando a queda do fruto.



Figura 2: Sintomatologia do olho de pavão. (a) Desfolhação da árvore e (b) manchas circulares de diferentes tonalidades na página superior das folhas. Fonte: Paula Baptista (IPB-CIMO).

O patogénico sobrevive durante o período desfavorável sobretudo nas folhas infetadas que permanecem na árvore. Os períodos do ano favoráveis à infeção ocorrem durante a primavera e o outono, quando a humidade relativa é alta e as temperaturas são amenas, sendo o valor óptimo de 15°C (TRAPERO-CASAS et al., 2009). Após infeção, o fungo desenvolve-se na camada subcuticular das folhas, acabando por emergir para o seu exterior os esporos que são responsáveis pela coloração escura das manchas. O intervalo de tempo entre a infeção e o aparecimento dos primeiros sintomas, conhecido como tempo de incubação, pode variar entre 1 e 10 meses, dependendo das condições climáticas (TRAPERO-CASAS et al., 2009). Os conídios produzidos na superfície da folha são, em seguida, dispersos por respingos de água ou

vento, originando infecções secundárias (TRAPERO-CASAS et al., 2009; VIRUEGA et al., 2013).

De entre as doenças que afetam a oliveira, **a gafa** é considerada como uma das que mais prejuízo causa nos países onde esta cultura tem expressão, incluindo Portugal (TALHINHAS et al., 2018; MARTINS et al., 2019). Esta doença afeta sobretudo os frutos, mas também outros órgãos da oliveira, incluindo flores, folhas e ramos (MARTINS et al., 2019). Assim, os sintomas característicos da doença são manchas enegrecidas, geralmente em depressão, com produção abundante de massas mucilaginosas alaranjadas de conídios no epicarpo dos frutos, que surgem principalmente quando estão quase maduros (Fig. 3) (CACCIOLA et al., 2012). O aparecimento destas manchas causa mumificação, apodrecimento e queda prematura dos frutos, levando a perdas significativas nas colheitas. Além de ser responsável por perdas consideráveis ao nível da produção da azeitona, esta doença contribui também para uma redução acentuada na qualidade do azeite (MORAL et al., 2014; SILVA, 2016). A nível nacional, esta doença é muito comum atingindo frequentemente níveis epidémicos causando, por vezes, perdas totais de rendimento (TALHINHAS et al., 2011). Em Trás-os-Montes, tem-se assistido nos últimos anos a um aumento da incidência e severidade da gafa (SILVA, 2016). Este fato poderá estar relacionado com a alteração das condições ambientais que favorecem o desenvolvimento da doença, requerendo uma humidade relativa superior a 90% e temperatura entre 17-20°C (CACCIOLA et al., 2012).



Figura 3: Sintomas típicos da gafa da oliveira. (a) Aparecimento na superfície da azeitona de uma massa alaranjada de conídios em manchas necróticas deprimidas; (b) em condições de secura, os frutos infetados desidratam e mumificam; (c) as folhas infetadas podem cair causando a desfolhação da árvore. Fonte: Paula Baptista (IPB-CIMO).

Esta doença tem sido associada a 13 espécies do género *Colletotrichum*, pertencendo principalmente a dois complexos, *C. acutatum* sensu lato (s.l.) e *C. gloeosporioides* s.l. (TALHINHAS et al., 2018). Dentre estas, seis espécies do complexo *C. acutatum* (*C. acutatum* sensu stricto (s.s.), *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*, *C. rhombiforme* e *C. simmondsii*) (BARONCELLI et al., 2017) e duas do complexo *C. gloeosporioides* (*C. gloeosporioides* s.s. e *C. theobromicola*) (MOSCA et al., 2014; SCHENA et al., 2014) têm sido identificadas como os agentes causais da gafa.

De todas estas espécies, *C. acutatum* s.s., *C. godetiae* e *C. nymphaeae* foram reconhecidas como sendo os principais agentes causadores da gafa à escala global (TALHINHAS et al., 2018). Em Portugal, os principais agentes causais da gafa são *C. nymphaeae* (80% dos isolados), *C. godetiae* (12% dos isolados) e *C. acutatum* s.s. (3-4% dos isolados), com *C. godetiae* causando grandes danos na região de Trás-os-Montes (TALHINHAS et al. 2009). Existem alguns relatos que associam a severidade da gafa à intensidade de ataque da mosca da azeitona (CACCIOLA et al., 2012). De facto, acredita-se que este inseto favorece a propagação de *Colletotrichum* spp. e ajuda no processo de infeção ao criar orifícios no fruto, que poderão funcionar como uma porta de entrada para o patogénico (CACCIOLA et al., 2012).

Pensa-se que a infeção pelo fungo se inicie nas flores e permaneça latente até ao desenvolvimento dos frutos, em particular até à sua maturação (MORAL et al., 2009);

TALHINHAS et al., 2018). A principal fonte de inóculo desta primeira infecção resulta do patogénico que sobrevive nos frutos afetados que permanecem na árvore durante o inverno, dispersando-se durante a primavera pela chuva (MORAL et al., 2009). No outono, com o amadurecimento do fruto e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do fungo (temperaturas entre 10 a 30°C e humidade relativa 80 a 90 %), surgem os sintomas da doença e numerosos ciclos secundários e epidemias severas (MORAL et al., 2009). O período de incubação da doença nesta fase é curto, podendo completar o seu ciclo em menos de 10 dias (MORAL et al., 2009).

A **cercosporiose**, causada pelo fungo *Pseudocercospora cladosporioides*, encontra-se presente nas principais áreas produtoras do mundo, sendo a sua importância variável em função da cultivar e das condições climáticas (ROMERO et al., 2020). Trata-se de uma doença menos conhecida pelos agricultores e geralmente confundida com o olho de pavão. As lesões manifestam-se sobretudo nas folhas, pedúnculos e frutos. Os sintomas típicos correspondem a manchas acinzentadas na página inferior das folhas, devido aos conídios do patogénico, e manchas amareladas na parte superior das folhas que, com o passar do tempo, se tornam necróticas (Fig. 4) (ÁVILA et al., 2020). Em variedades muito suscetíveis, há necrose marginal e apical das folhas que pode ser confundida com carência de potássio (TRAPERO et al., 2011). Esta doença origina a queda precoce das folhas, diminuição da produção de flores nos anos seguintes e um atraso no amadurecimento dos frutos. Os sintomas nos frutos variam muito consoante o estágio de maturação, podendo apresentar lesões deprimidas mais ou menos circulares e de coloração acastanhada (ÁVILA et al., 2020). Em frutos verdes estas lesões circulares podem ter 3-7 mm de diâmetro. Em frutos maduros as lesões são mais extensas e podem ser circundadas por um halo claro ou amarelado (ÁVILA et al., 2020). A doença também pode afetar os pedúnculos na zona de abscisão causando queda acentuada de frutos.



Figura 4: Sintomas típicos da cercosporiose. (a) Manchas amareladas na parte superior das folhas que se tornam necróticas com o passar do tempo; (b) manchas acinzentadas na página inferior das folhas; (c) lesões deprimidas mais ou menos circulares e de coloração acastanhada nos frutos. Fonte: Ávila et al., 2020 (figuras a e b); Paula Baptista (IPB-CIMO) (figura c).

O fungo *P. cladosporioides* sobrevive durante o inverno nas folhas infetadas que permanecem na árvore e/ou no solo (ÁVILA et al., 2020). Os conídios produzidos pelo fungo são disseminados pelas correntes de ar e pela chuva, ocorrendo infeções de folhas e de frutos. Este processo de infeção ocorre sobretudo em condições de elevada humidade e temperaturas a variar de 5 a 25°C, sendo ótima a 18 a 22°C (ÁVILA et al., 2020). Os períodos de incubação e produção de conídios são geralmente longos (de 28 dias a 9 meses), sendo as folhas novas mais suscetíveis à infeção (Ávila et al., 2020).

A **fumagina** é causada pelo fungo saprófita *Capnodium elaeophilum*, que coloniza a superfície das folhas, ramos, troncos e frutos. O desenvolvimento desse fungo resulta da produção de meladas (exsudato ricos em hidratos de carbono) que são excretadas por uma praga da oliveira, a cochonilha negra (*Saissetia oleae*) (NAVERO et al., 2017). O crescimento deste fungo sobre a superfície de todos os órgãos aéreos da oliveira dão-lhe um aspecto enegrecido (Fig. 5a), e podem reduzir a área fotossintética da planta e, conseqüentemente, a produtividade final, a respiração e a transpiração através das folhas (NAVERO et al., 2017). A maior incidência desta doença verifica-se sobretudo no outono e na primavera, e em olivais densos ou mal ventilados, localizados em áreas baixas e húmidas (NAVERO et al., 2017).

O **escudete** é causado pelo fungo *Botryosphaeria dothidea*, afetando especialmente frutos verdes, formando pequenas lesões necróticas pardas, deprimidas e com bordos elevados, nas quais se observa a presença de pequenos corpos de frutificação de coloração escura (Fig. 5b) (MORAL et al., 2010). Os frutos muito afetados apresentam sintomas de desidratação completa, acabando por cair ao solo mumificados. O desenvolvimento do escudete é favorecido por temperaturas amenas entre 22 e 28° C e humidade relativa elevada (MORAL et al., 2010).

A infecção por este fungo é ainda favorecida pela presença de feridas nos frutos e que tem sido relacionada com os ataques da mosca da azeitona (GONZÁLEZ & TRAPERO, 2006).

A **lepra**, causada pelo fungo *Neofabraea vagabunda*, infeta sobretudo o fruto em qualquer estágio de maturação (desde verde a maduro). Os sintomas típicos desta doença consistem na formação de lesões necróticas circulares, deprimidas e delimitadas por um bordo mais escuro, que resulta na mumificação total ou parcial do fruto, seguido pela sua queda (Fig. 5c) (ROONEY-LATHAM et al., 2013). Esta sintomatologia é muito similar com a da cercosporiose e escudete sendo, por isso, necessário comprovar no laboratório a presença de conídios do patogénico nas lesões. A infecção do fruto pelo fungo ocorre sobretudo no outono, onde se verificam chuvas abundantes e temperaturas amenas, e é favorecida pela presença de feridas na superfície das azeitonas (ROCA et al., 2007). Para além dos frutos, também os ramos podem ser infetados por *N. vagabunda* originando cancos (ROMERO et al., 2015). Neste caso é necessário a ocorrência de feridas para que surja infeções.

As **podridões associadas ao fruto** são comparativamente menos estudadas face às doenças anteriormente mencionadas. Este fato deve-se sobretudo à sua reduzida importância. Estas podridões são frequentemente causadas por patogénicos secundários, que infetam preferencialmente frutos maduros ou em processo de maturação (TRAPERO et al., 2011). Estas podridões podem estar associadas a várias espécies fúngicas pertencentes aos géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Phomopsis*, entre outros (NAVERO et al., 2017), e com exibição de diferentes sintomatologias (Fig. 5d). Por exemplo, os frutos infetados por *Alternaria alternata* apresentam lesões secas, levemente deprimidas e negras, enquanto que os infetados por *Cladosporium* apresentam-se mumificados e cobertos por um micélio esverdeado. Regra geral, o desenvolvimento destas podridões no fruto é favorecido em épocas do ano em que a humidade relativa é alta e as temperaturas rondam entre os 22 e 28° C (NAVERO et al., 2017).



Figura 5: Sintomas típicos de diversas doenças fúngicas que afetam a parte aérea da oliveira. (a) Fumagina; (b) Escudete; (c) Lepra; (d) Várias podridões associadas à azeitona. Fonte: Paula Baptista (IPB-CIMO).

De entre os fungos que causam **cancros nos ramos da oliveira**, *Eutypa lata* e *Comoclathris incompta*, têm sido identificados como sendo os mais prejudiciais causando dessecação apical e morte de ramos (TRAPERO et al., 2011). Tal como mencionado anteriormente, outro cancro que tem vindo a ganhar importância, sobretudo em Espanha, é causado pelo fungo *N. vagabunda* (ROMERO et al., 2015). Nos últimos anos tem-se também vindo a assistir ao aumento da incidência de um cancro causado por *Neofusicoccum mediterraneum* na região de Andaluzia, em Espanha (MORAL et al., 2010).

2.2.2. Doenças fúngicas da parte radicular

A **verticilose**, causada pelo fungo *Verticillium dahliae*, é a doença vascular mais importante da oliveira (MONTES-OSUNA & MERCADO-BLANCO, 2020). Atualmente, foi detectada em quase todos os países da bacia do Mediterrâneo e em outras regiões do mundo que se dedicam ao cultivo da oliveira (MONTES-OSUNA & MERCADO-BLANCO, 2020).

Esta doença pode apresentar dois tipos de sintomatologia diferentes, de acordo com o patógeno que provoca infecção (desfolhante e não desfolhante), e vulgarmente designados por apoplexia e declínio lento (LÓPEZ-ESCUADERO & MERCADO-BLANCO, 2011).

A infecção desfolhante verifica-se sobretudo durante o outono/inverno e consiste na morte rápida dos ramos ou da árvore (Fig. 6). As folhas começam por perder a coloração verde intensa adquirindo uma tonalidade amarelada-acastanhada e a enrolar. Estas folhas permanecem, na maioria dos casos, presas à árvore podendo, no entanto, cair quando as árvores são jovens. O declínio lento ocorre principalmente na primavera, e apresenta como sintomas característicos a seca e mumificação das inflorescências que permanecem aderentes à árvore, e pela queda generalizada e intensa das folhas ainda verdes.

A sintomatologia da apoplexia e declínio lento podem surgir numa mesma árvore, dependendo da duração das condições propícias ao desenvolvimento da doença. Nos casos em que as infecções de primavera se distendeu por mais tempo é possível observar no outono a mumificação dos frutos (Fig. 6d). Em ambos os casos o córtex dos ramos afetados pode tornar-se arroxeadado e os tecidos do xilema apresentarem coloração castanho escuro (LÓPEZ-ESCUADERO & MERCADO-BLANCO, 2011). O agente patogênico tem a particularidade de conseguir sobreviver no solo por períodos bastante longos (superior a 10 anos) devido à sua capacidade de produzir estruturas de resistência, designadas por microescleródios (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2012). O processo de infecção inicia-se com a germinação destas estruturas no solo que, ao emitirem hifas, penetram nas raízes da planta. Ao alcançarem o sistema vascular, o fungo impede o fluxo de seiva (LÓPEZ-ESCUADERO & MERCADO-BLANCO, 2011). A severidade da doença é condicionada pela quantidade e virulência do inóculo fúngico presente no solo (microescleródios por grama de solo), características da oliveira (resistência varietal, estado nutricional, idade, entre outros) e fatores edafo-climáticos (temperatura, humidade, tipo de solo, entre outros) (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2012).



Figura 6: Sintomas típicos da verticilose. (a) Apoplexia onde se observa a rápida e extensa morte de ramos, sustentando as folhas amareladas; Sintomas do declínio lento com (b) desfoliação das folhas verdes, (c) necrose das inflorescências e (d) mumificação dos frutos. Fonte: López-Escudero & Mercado-Blanco (2011).

A *Phytophthora*, é um agente patogénico de numerosas espécies de plantas lenhosas e árvores frutíferas, incluindo a oliveira (SÁNCHEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 1998; DOMSCH *et al.*, 1980). Trata-se de um problema fitopatológico emergente no olival, registando-se um aumento da sua incidência sobretudo em olivais com solos encharcados e argilosos, muito compactados. *Phytophthora* é responsável pela podridão e murcha das raízes. As raízes infetadas ficam inicialmente cobertas por um micélio branco, parecido com algodão, que posteriormente escurece, apresentando coloração cinza-esverdeada ou preta, fazendo com que a epiderme da raiz escureça e se desprenda (BRASIER *et al.*, 2003; CACCIOLA *et al.*, 2007; KURBETLI *et al.*, 2016). As plantas infectadas apresentam as folhas amareladas, murchas ou enrugadas, acabando por cair no solo.

Várias espécies fúngicas pertencentes ao género *Cylindrocarpon* têm sido identificadas como sendo responsáveis pela podridão das raízes na oliveira, causando redução na produção (RAHMAN, 2005; CABRAL *et al.*, 2012). Condições de estresse que favorecem o

desenvolvimento da doença incluem desnutrição, má drenagem da água e compactação do solo (LARIGNON, 1999; FOURIE et al., 2000).

De igual modo, várias espécies do género *Fusarium*, têm sido identificadas como sendo responsáveis pela podridão radicular na oliveira (VETTRAINO et al., 2009; PEREZ et al., 2011; DOMINGUES et al., 2020; GHARBI et al., 2020). A incidência desta podridão nos olivais tem vindo a aumentar nos últimos anos, o que tem sido associado à redução da fertilidade dos solos (DOMINGUES et al., 2020; GHARBI et al., 2020). Esta doença tem causado prejuízos sobretudo em viveiros e em olivais jovens, nos primeiros anos após a instalação (GHARBI et al., 2020).

2.2.3. Doenças bacterianas da parte aérea

A **tuberculose**, causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), é uma das principais ameaças à produção da oliveira em todo o mundo (QUESADA et al., 2012). Nos últimos anos, o impacto económico desta doença aumentou drasticamente, principalmente devido à intensificação do cultivo da oliveira que favorece a infeção e disseminação do patogénico (TOUS et al., 2010). A infeção por esta bactéria dá-se em locais onde ocorreram feridas, produzindo tumores principalmente nos caules e ramos, que podem resultar na sua morte ou de árvores jovens inteiras (Fig. 7) (QUESADA et al., 2012). Ocasionalmente a bactéria também pode infetar folhas e frutos (QUESADA et al., 2012). A bactéria está normalmente presente na parte aérea da oliveira, podendo colonizar a superfície (colonização epifítica) e o interior dos tecidos vegetais (QUESADA et al., 2012). Pensa-se que a infeção possa ser causada pelas bactérias epifíticas, que demonstraram capacidade em sobreviver por muitos anos na parte aérea da oliveira (QUESADA et al., 2010) A Pss está normalmente associada a outras espécies bacterianas, pertencentes sobretudo ao género *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Erwinia* e *Curtobacterium* (HOSNI et al., 2011; PASSOS DA SILVA et al., 2014; BUONAURO et al., 2015;). Estas bactérias demonstraram ter um papel importante na incidência e severidade da doença ao induzirem um aumento da população Pss e promoverem o desenvolvimento de sintomatologia (HOSNI et al., 2011; PASSOS DA SILVA et al., 2014; Buonauro et al., 2015). A tuberculose é responsável pela diminuição do vigor da árvore, atrofiamento dos ramos, desfoliação e conseqüentemente perda da área fotossintética, podendo em casos graves culminar na morte da árvore (QUESADA et al., 2012).

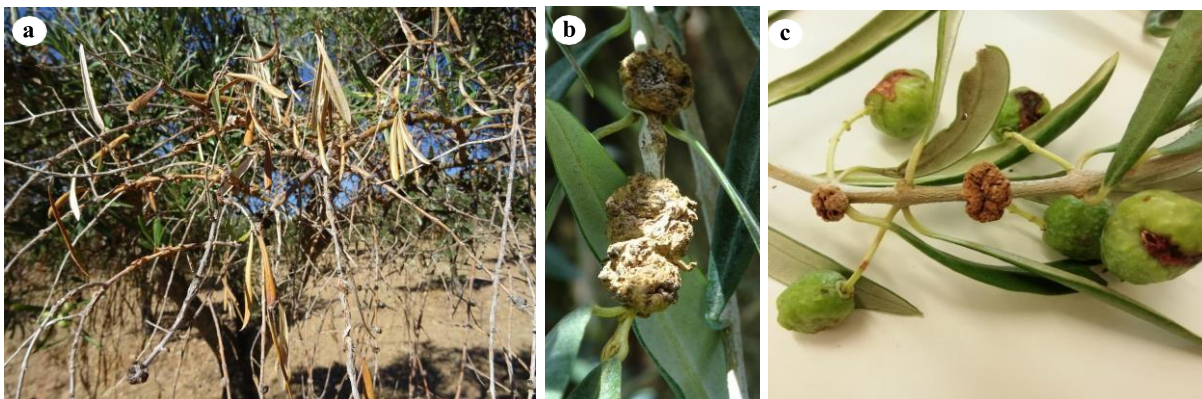


Figura 7: Sintomas típicos da tuberculose. (a) seca e quebra dos ramos; (b) formação de tumores que surgem nos rebentos e ramos jovens; (c) deformação dos frutos e formação de tumores nos pedúnculos, em infeções graves. Fonte: Paula Baptista (IPB - CIMO).

A **síndrome do declínio rápido da oliveira** é uma doença que foi identificada na Europa, pela primeira vez em 2013, em olivais no sul de Itália (SAPONARI et al., 2013). É provocada pela bactéria *Xylella fastidiosa* subs *pauca*, classificada como organismo de quarentena estando na Lista A1 da Organização Europeia para a Proteção de Culturas (EPPO). A estirpe de *X. fastidiosa* associada a esta doença está geneticamente relacionada com a subespécie *pauca*, e foi designada como CoDiRO, que constitui uma abreviação do nome da doença em italiano (MARTELLI et al., 2016).

Genericamente, os sintomas da doença na oliveira caracterizam-se pela clorose e queima da margem das folhas, que se inicia na zona apical da copa e que acaba por se estender a toda a árvore (Fig. 8). Em estado avançado da doença, as oliveiras adquirem uma estrutura similar a um esqueleto, da qual são emitidos numerosos rebentos a partir da base do tronco. Os danos causados pela bactéria são resultado da aderência das células bacterianas às paredes dos vasos xilémicos, local da planta onde a bactéria se encontra presente. Após a adesão, as bactérias iniciam o crescimento celular com formação de biofilme, causando a obstrução dos vasos xilémicos, impedindo o transporte de água e de sais minerais (NAVARRETE & DE LA FUENTE, 2014). A obstrução completa dos vasos xilémicos origina deficiências nutricionais e stresse hídrico, afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Esta bactéria patogénica é transmitida, a maior parte das vezes, por insetos que se alimentam de xilema de plantas que pertencem à ordem Hemiptera, em especial às famílias Cercopoidea (cigarrinhas), Cicadoidea (cigarras) e Membracoidea e, desta última apenas a subfamília Cicadellinae (CAVALIERI et al., 2019). O inseto, através da sua armadura bucal picadora-sugadora, suga o fluido xilémico contaminado com a bactéria e, quando se dirigem para se alimentarem numa outra planta do mesmo modo, introduzem a bactéria, infetando essa

mesma planta.

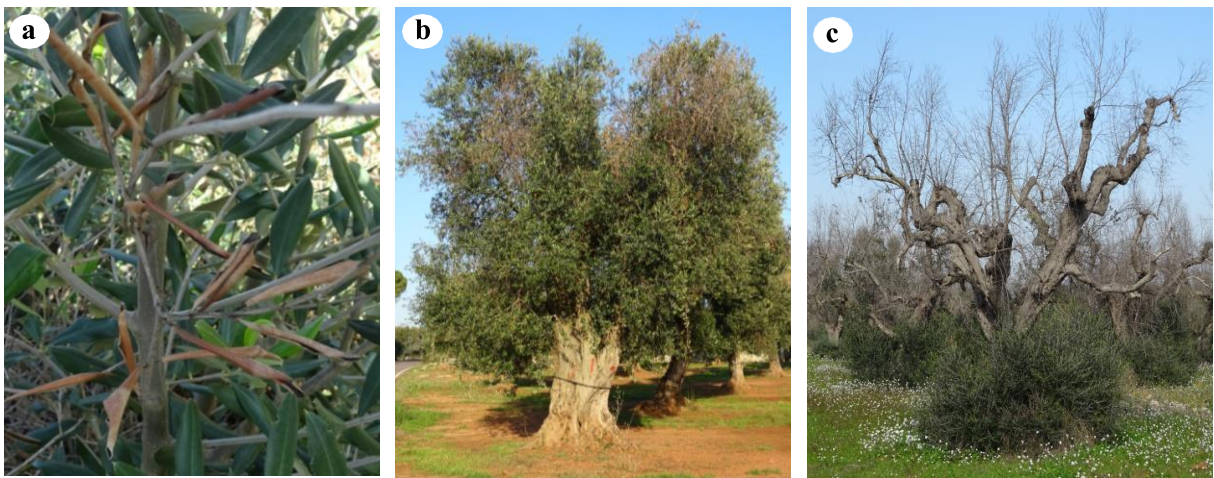


Figura 8: Sintomas típicos síndrome do declínio rápido da oliveira causados por *Xylella fastidiosa subsp. pauca*. (a) Sintomatologia nas folhas; (b) secagem de ramos na zona apical da copa; (c) Árvore com estrutura similar a um esqueleto, com emissão de rebentos a partir da base do tronco. Fonte: José Alberto Pereira (IPB-CIMO).

2.3. Principais doenças na região de Trás-os-Montes

Na região de Trás-os-Montes o olival possui uma enorme importância económica, social e paisagística. Em 2018, as 39.284 explorações olivícolas existentes nesta região foram responsáveis por produzir 108.821 toneladas de azeitona (INE, 2019). O azeite aqui produzido possui atributos únicos e elevada qualidade que se devem às características edafoclimáticas distintos da região, aliadas à presença de cultivares tradicionais e às práticas culturais adotadas (PERES et al., 2011). Estes aspetos permitiram a criação da denominação de origem protegida (DOP) “Azeites de Trás-os-Montes”. Para além de benefícios económicos, este setor tem uma enorme importância a nível social e paisagístico. A cultura da oliveira para além de constituir uma importante fonte de emprego e, conseqüentemente, contribuir para a fixação das populações rurais, é uma parte importante da cultura rural e uma marca da paisagem na região Transmontana.

Nesta região as principais doenças que afetam o olival são a tuberculose, o olho de pavão e, mais recentemente, a gafa. No entanto, nos últimos anos o nosso grupo de investigação tem vindo a observar um aumento de incidência de outras doenças que, até então, não tinham importância. De entre estas destacam-se a cercosporiose e a lepra. Adicionalmente, tem-se observado em vários olivais na região de Mirandela um aumento de incidência de podridões no fruto e, para as quais, não se tem informação sobre o agente causal. Com o intuito de se conhecer melhor a causa destas podridões iniciaram-se estudos que visavam a descrição da

sintomatologia, o isolamento de microrganismos associados à podridão e a sua identificação. Para tal, procedeu-se ao isolamento de fungos a partir de azeitonas colhidas no campo, em dois olivais em Mirandela, e que apresentavam as lesões de podridão. Do total de isolados obtidos, verificou-se a elevada frequência de ocorrência de uma morfoespécie, pertencente ao género *Neocosmospora*, sugerindo tratar-se do potencial agente causal. No presente trabalho pretende-se dar continuidade a este estudo, pela identificação desta espécie e avaliação da sua patogenicidade através da aplicação dos postulados de Koch. Adicionalmente, pretende-se avaliar a influência de outras espécies fúngicas vulgarmente presente nos frutos na patogenicidade deste fungo. Este aspeto é extremamente importante uma vez que a maioria das podridões que ocorrem no fruto resultam de infeções secundárias (TRAPERO et al., 2011) e, conseqüentemente, a interação microrganismo-microrganismo poderá ter um papel importante no desenvolvimento das lesões.

2.4. Interações entre espécies no desenvolvimento de doenças

Vulgarmente considera-se que as doenças nas plantas são causadas por uma única espécie ou mesmo um isolado específico. No entanto, na natureza, os microrganismos não vivem isoladamente, mas sim em comunidades complexas onde estabelecem interações entre si (HASSANI et al., 2018). Recentemente foi proposto que o desenvolvimento de doenças nas plantas não depende exclusivamente da interação que se estabelece entre planta hospedeira-patogénico-ambiente (HASSANI et al., 2018). Nesta relação também podem intervir outros microrganismos não patogénicos, presentes no sítio da infeção, que podem ter um efeito positivo ou negativo na atividade do patogénico e conseqüentemente no desenvolvimento da doença (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2014, JAKUSCHKIN et al., 2016). Por exemplo, algumas bactérias não patogénicas do género *Pantoea* e *Erwinia*, que frequentemente cohabitam com o agente causal da tuberculose na oliveira (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*), demonstraram cooperar mutuamente, tendo como resultado um aumento na severidade da doença (HOSNI et al., 2011; PASSOS DA SILVA et al., 2014). Similarmente, foi descrito a importância da presença de determinadas espécies de fungos para o desenvolvimento da tuberculose em ramos de oliveira (GOMES et al., 2019).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos em estudo

No presente estudo foram utilizados os seguintes microrganismos: (1) espécie fúngica considerada como sendo o potencial agente causal da podridão da azeitona, (2) *Kocuria* sp. (bactéria Gram-positiva), e (3) *Vishniacozyma* cf. *victoriae* (levedura). Estes microrganismos foram previamente isolados de frutos com podridão (no caso da espécie 1) ou assintomáticos (espécies 2 e 3) colhidos em dois olivais localizados no concelho de Mirandela, em setembro e outubro de 2019. Ambos os olivais são constituídos maioritariamente pelas cultivares Madural e Cobrançosa, e estão em modo de produção integrada. Das espécies microbianas mencionadas foram utilizadas apenas um isolado, tendo os isolados *Kocuria* sp. e *V. victoriae* sido anteriormente identificados molecularmente como sendo as que possuem uma maior frequência de ocorrência e abundância em azeitonas, em estudos prévios do nosso grupo de trabalho (LOPES, 2020). Todos os isolados encontram-se depositados na coleção de culturas de microrganismos do CIMO-IPB (CIMO-CC), estando preservados em glicerol a 30%, a -80 °C, com os códigos F1 (espécie fúngica a caracterizar).

3.2. Caracterização morfológica e molecular do potencial agente causal

Numa primeira parte do trabalho pretendeu-se identificar e caracterizar a espécie fúngica (designada por F1) que surge frequentemente associada à podridão da azeitona, quer por processos morfológicos como moleculares.

Para proceder à caracterização morfológica e molecular do potencial agente causal da podridão dos frutos, o isolado F1 foi cultivado em meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA, Panreac AppliChem), no escuro, durante 10 dias e à temperatura ambiente (20-25°C). Ao fim deste tempo procedeu-se à avaliação das características macroscópicas e microscópicas das colónias utilizando para o efeito um microscópio óptico (Leica DM2000), com montagem em azul de algodão.

A identificação molecular do isolado F1 foi efetuada pela amplificação e sequenciação da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA nuclear ribossomal utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Para tal, procedeu-se inicialmente à extração de DNA de micélio fúngico utilizando o kit REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma-Aldrich). A 0,1 g de micélio, retirado de uma colónia com 10-15 dias de crescimento em meio PDA, foram adicionados 25 µL de tampão de extração. Após mistura, as amostras foram incubadas à

temperatura de 95°C, durante 10 min, às quais foi adicionado em seguida 50 µl de solução diluição. A amplificação da região ITS foi efetuada usando o mesmo Kit da extração de DNA, no termociclador MyCycler (BioRad). A mistura da reação possuía 5µl tampão, 1 µl dNTP-mix, 1,5 µl MgCl₂ e 0,2 µl Taq polimerase, 1 µl de ITS1 (10 µM), 1 µl de ITS4 (10 µM), 36,3 µl água ultrapura e 4 µl de DNA. Foi ainda realizado um controlo negativo (sem DNA). O ciclo de temperaturas utilizado na amplificação foi 94°C durante 3 min (1 ciclo); 94°C durante 30 s, 53°C durante 50 s, 72°C durante 2 min (35 ciclos); e 72°C durante 10 min (1 ciclo).

A qualidade do DNA amplificado foi avaliada por eletroforese, em tinas horizontais (BioRad), através de géis de agarose (1,3%) em tampão TBE (1X) (Tris base 89 mM, ácido bórico 89mM e EDTA 2 Mm, pH 7,6). Os produtos de PCR (13 µL) foram carregados no gel juntamente com (2 µL) de tampão de carregamento (6X) Loading Dye Blue (Bioron, Alemanha). Nos poços da extremidade do gel foi colocado o marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Bioron, Alemanha), na quantidade recomendada pelo fornecedor. A separação eletroforética foi efetuada a uma diferença de potencial de 100 V por 45 minutos e, para corar as bandas, após a corrida o gel foi mergulhado numa solução aquosa de GelRed™ Biotum (3X), por 45 a 60 minutos. Os géis foram visualizados pelo ChemiDoc™ XRS+with Image Lab™ Software da BioRad (Hercules, Califórnia).

Após boa confirmação, os produtos de PCR foram enviados para sequenciar na empresa Macrogen (Espanha), utilizando os *primers* anteriormente descritos. As sequências de DNA obtidas (região ITS) foram analisadas utilizando o pacote de programas DNASTAR versão 2.58 (Lasergene). Recorrendo ao servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizando o algoritmo BLAST, foi analisada a homologia das sequências obtidas com outras sequências presentes na base de dados GenBank. Os resultados foram classificados de acordo com o maior grau de similaridade e o menor *E-value* (*Expected value*).

Utilizando a sequência de ITS do isolado F1, foi ainda realizada uma análise filogenética para confirmar a sua identificação e reconhecer qual a sua posição dentro do complexo de espécies anteriormente atribuído a *Fusarium solani* (FSSC), espécies que agora se reconhece pertencerem ao género *Neocosmospora* (SANDOVAL-DENIS et al., 2019;). Para a construção da árvore a sequência de F1 foi alinhada com sequências, que foram previamente obtidas a partir da base de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (CLARKE et al., 2016). Para este alinhamento múltiplo de sequências foi utilizado o algoritmo ClustalW, no programa informático MEGA X (KUMAR et al., 2018). Depois de visualmente inspecionado o alinhamento, e utilizando o mesmo programa, foi então realizada a análise filogenética. Determinou-se primeiro qual o melhor modelo de substituição para os dados, tendo depois sido

inferida a árvore filogenética através do método da Máxima Verosimilhança (MV) e empregue o modelo GTR+G+I (*General Time Reversible*). Foram realizadas 1000 repetições de bootstrap. Esta análise filogenética envolveu 16 sequências, existindo 779 posições no conjunto de dados (i.e., no alinhamento).

3.3. Preparação das suspensões de esporos/células (inóculos)

Para os ensaios de patogenicidade e avaliação do efeito de *Kocuria* sp. e *V. victoriae* no processo infeccioso de F1 foi necessário a preparação prévia de inóculos destes microrganismos. Para a obtenção do inóculo de *Kocuria*, retiraram-se da extremidade das colónias de *Kocuria* sp. em meio LBA (Luria-Bertani agar; para 1000 mL: 10g triptona, 10g agar, 5g extrato de levedura e 10g cloreto de sódio) com 2 dias de crescimento, inóculo bacteriano que foi transferido para 5 mL de meio líquido LB. Após agitação num agitador rotativo (100 rpm) por 2 minutos à temperatura 25°C, procedeu-se à leitura da densidade celular a 600nm seguida pelo ajustamento da densidade óptica ($OD_{600}=0,5$) para uma concentração de 10^8 UFC/mL. Para a obtenção de inóculo dos isolados F1 e *V. victoriae*, os microrganismos foram cultivados durante 10 (para F1) ou 2 (para *V. victoriae*) dias em meio PDA (Panreac AppliChem), a 20-25°C, no escuro. Após incubação, efetuou-se uma suspensão de esporos/células de cada isolado. As suspensões foram preparadas retirando uma porção de agar com micélio/células e transferindo-a para uma solução aquosa estéril de 0,025% (v/v) de Tween 80, que por sua vez, tem a função de solubilizar o material de estudo em meio líquido. A suspensão foi vortexada e a concentração de esporos/células foi, em seguida, ajustada para 10^8 UFC/mL, com o auxílio de uma câmara de Neubauer, sob microscópio óptico.

3.4. Avaliação da patogenicidade do isolado F1 e da influência de outros microorganismos colonizadores da Oliveira

Num primeiro ensaio (A) foi avaliado a patogenicidade do isolado F1 pela aplicação dos postulados de Koch, quer em ensaios de laboratório, pela inoculação de azeitonas, quer em campo, pela inoculação de ramos de oliveira em condições controladas. Para tal procedeu-se à inoculação de azeitonas/ramos com uma destas espécies endofíticas, e sete dias depois inoculou-se uma suspensão de esporos de *N. solani*. Utilizaram-se como controlo positivo azeitonas/ramos inoculados com *N. solani* e como controlo negativo azeitonas/ramos inoculados com tampão/meio LB. Em seguida, procedeu-se a um segundo ensaio (B) com o

intuito de avaliar a influência de *Kocuria* sp. e *V. victoriae* no processo infeccioso de F1, utilizando uma metodologia similar ao do ensaio A.

Para comprovar que os endófitos não exerciam qualquer efeito negativo na oliveira foi incluído, ainda neste estudo, um tratamento que envolveu a inoculação de azeitonas/ramos com cada um dos endófitos. Ao longo do tempo avaliou-se a incidência e a severidade da doença e, no final dos ensaios, procedeu-se ainda à determinação da quantidade de esporos produzido por *N. solani*, bem como à avaliação da sua viabilidade (i.e., germinação).

3.4.1. Ensaio em laboratório

Para a implantação dos ensaios, foram utilizadas azeitonas assintomáticas da cv. Cobrançosa, com os índices de maturação 4 (epiderme preta e polpa branca) (HERMOSO et al., 2001). Após a lavagem em água corrente, as azeitonas foram esterilizadas superficialmente por imersão sequencial em etanol 70% (v / v) por 1 min., hipoclorito de sódio 3-5% (v / v) por 2 min e, em seguida, enxaguadas três vezes (1 min. cada) com água destilada estéril. Posteriormente, cinco frutos esterilizados foram colocados em frascos de vidro redondos (7 cm de diâmetro e 8 cm de altura) contendo papel filtro esterilizado (Whatman nº 4). Para os ensaios de avaliação da patogenicidade de F1 (ensaio A), procedeu-se à inoculação dos frutos com 3mL de suspensão de esporos de F1 (10^8 esporos/mL). Como controlo, foram usadas azeitonas inoculadas com 3mL de solução aquosa estéril de 0,02% (v / v) Tween 80. Nos ensaios para avaliar a influência de *Kocuria* sp. e *V. victoriae* no processo infeccioso de F1 (ensaio B), inocularam-se os frutos com *Kocuria* sp. ou *V. victoriae* (3 ml de suspensão de esporos, 10^8 esporos/mL), e passados 7 dias, foram inoculados com 3mL de suspensão de esporos de F1 (10^8 esporos/mL). Os controles foram realizados inoculando azeitonas com 3mL de solução aquosa estéril de 0,02% (v / v) Tween 80 (para *V. victoriae*) ou LB (para *Kocuria* sp.), ou suspensão de esporos do F1 (10^8 esporos/mL). Para cada tratamento foram efetuadas cinco repetições, cada uma contendo cinco frutos. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente (25 ± 4 °C), em fotoperíodo alternado (luz/escuro), e o papel filtro foi mantido húmido durante todo o ensaio para criar as melhores condições de ocorrência de infecção. Tanto a incidência (i.e., a percentagem de frutos infectados) como a severidade (i.e., a proporção da área do fruto afetada) da podridão foram avaliadas ao fim de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação do F1.

3.4.2. Ensaio em condições de campo

Os ensaios em condições de campo foram conduzidos em Mirandela, no mesmo olival onde se procedeu à colheita de azeitonas para o isolamento de fungos associados à podridão. Neste ensaio utilizou-se um delineamento experimental de blocos casualizado, com seleção de 10 árvores da cv. Cobrançosa, sendo que 5 destas árvores foram destinadas aos ensaios com *Kocuria* sp. e as restantes 5 foram utilizadas para os ensaios da *V. victoriae*. Em cada árvore, foi inoculado: i) um ramo com 0,02% (v / v) Tween 80 (para *V. victoriae*) ou LB (para *Kocuria* sp.) (controlo negativo); ii) um ramo com *Kocuria* sp. ou *V. victoriae*; iii) um ramo com *Kocuria* sp. ou *V. victoriae* e passados 7 dias com F1; iv) um ramo com F1 (controlo positivo). A inoculação foi efetuada por pulverização, colocando 40 mL de uma suspensão de esporos/células a 10^8 esporos/mL. Os ramos foram cobertos com saco plástico e vedados com fio. Após 22 dias de inoculação com F1, os ramos foram colhidos, transportados para o laboratório e postos a incubar em câmara húmida por 30 dias, para avaliação da incidência e severidade da podridão (Figura 9).

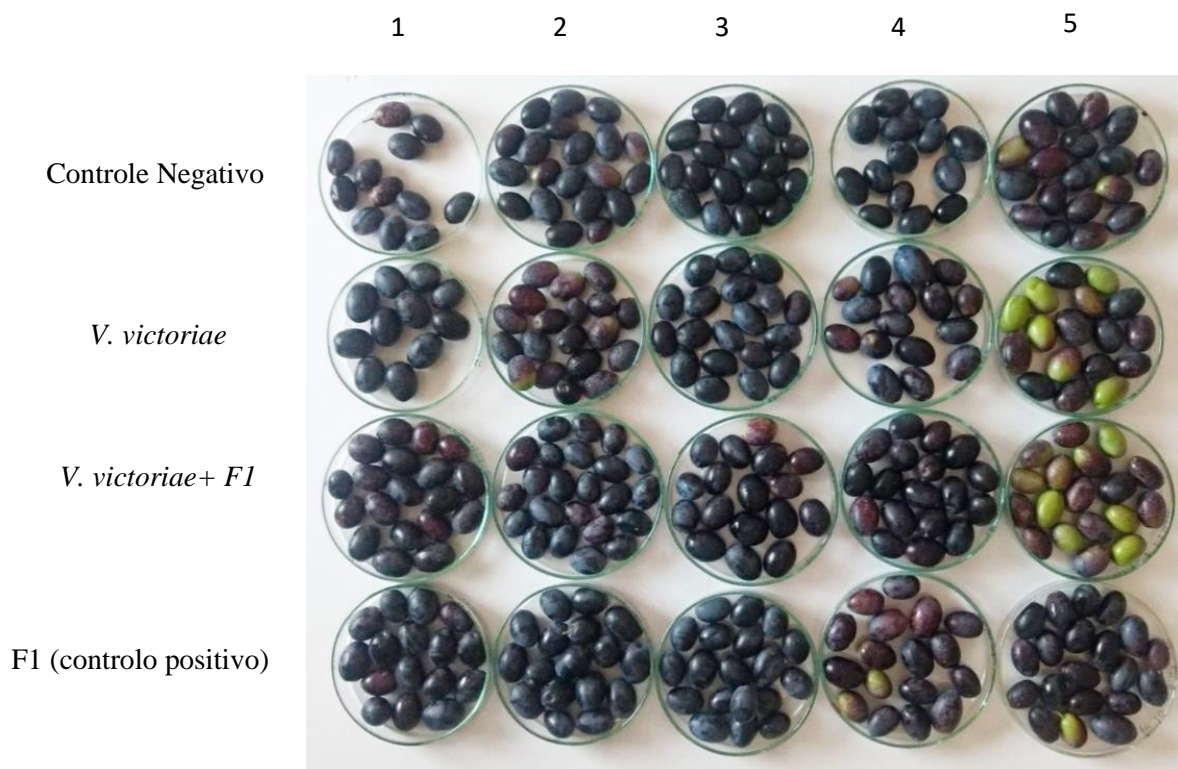


Figura 9: Azeitonas divididas por tratamento para os ensaios em campo com *V. victoriae*. Os números representam as árvores.

3.4.3. Parâmetros avaliados

Incidência e severidade

A incidência da podridão foi determinada pela percentagem de frutos infectados usando a seguinte fórmula:

$$\text{Incidência (I)} = \frac{\text{Número de frutos infectados}}{\text{Número total de frutos testados}} \times 100$$

A severidade foi estimada pela avaliação da área do fruto afetada. Para tal, foi utilizado uma escala de classificação que varia de 0 a 5, onde 0 = nenhum sintoma visível, 1 = sintomas visíveis afetando menos que 25% da superfície do fruto, 2 = 25-49 %, 3 = 50-74%, 4 = 75-100% e 5 = fruta completamente apodrecida.

A área sob a curva de progresso da incidência (ASCPDi) e severidade (ASCPDs) da podridão, para cada tratamento nos ensaios de azeitona e de campo, foi determinada usando os dados de incidência e severidade, recorrendo à seguinte expressão (MORAL et al. 2008):

$$\text{ASCPD}_{i \text{ ou } s} = \sum_{i=1}^n [(I_{i+1} + I_i)/2](t_{i+1} - t_i)$$

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

Esporulação

No final dos ensaios (quer das azeitonas como no campo) procedeu-se à avaliação da quantidade de esporos produzida pelo F1, nos frutos de cada um dos tratamentos realizados. Para tal, obtiveram-se suspensões de esporos em 5mL de solução aquosa de Tween 80 (0,02% v/v) a partir de frutos de uma repetição de cada tratamento: F1, *Kocuria* sp. + F1, e *V. victoreae* + F1. A concentração de esporos nesta suspensão (esporos/mL) foi determinada numa câmara de contagem Neubauer. A capacidade de *Kocuria* sp. ou *V. victoreae* em inibir a esporulação do F1 foi estimada usando a equação:

$$\text{Inibição da esporulação (\%)} = [(EC-ET)/EC] \times 100$$

onde EC é a esporulação do F1 no controlo, e ET é a esporulação do F1 na presença de *Kocuria* sp. ou *V. victoreae*.

Germinação

A viabilidade dos esporos produzidos por F1 nos frutos de cada um dos tratamentos foi avaliada através de microcultivo e exame direto em lâmina. Para tal, lâminas de microscopia esterilizadas e cobertas com uma fina camada de ágar água (ágar-ágar 15 g / L) foram inoculadas com a mesma suspensão de esporos F1 utilizada para quantificar a esporulação. Após incubação a 25 ± 2 ° C no escuro por 10h, a percentagem de germinação foi avaliada pela contagem do número de esporos germinados e não germinados, de uma média total de 150 esporos por lâmina, utilizando-se microscópio com 400 aumentos. Para cada tratamento fez-se cinco lâminas. A capacidade de *Kocuria* sp. ou *V. victoreae* em reduzir a germinação de F1 foi estimada usando a mesma fórmula de cálculo para a esporulação.

3.5. Análise estatística

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização morfológica e molecular do potencial agente causal

No que concerne à caracterização morfológica, procedeu-se à avaliação macroscópica das colónias fúngicas sob condições padrão, ou seja, em meio de cultivo PDA e incubação a 20-25°C. Sob estas condições, o isolado exibiu um crescimento rápido, com taxas médias de crescimento diametral entre 3,5 e 6 mm/dia. Ao fim de 10 dias de crescimento as colónias apresentavam uma coloração branca e/ou creme claro, com crescimento radial e margens regulares (Fig. 10a). A observação microscópica revelou a produção de hifas septadas e hialinas, e de conídios fusiformes, contendo 2 a 3 septos (Fig. 10b).

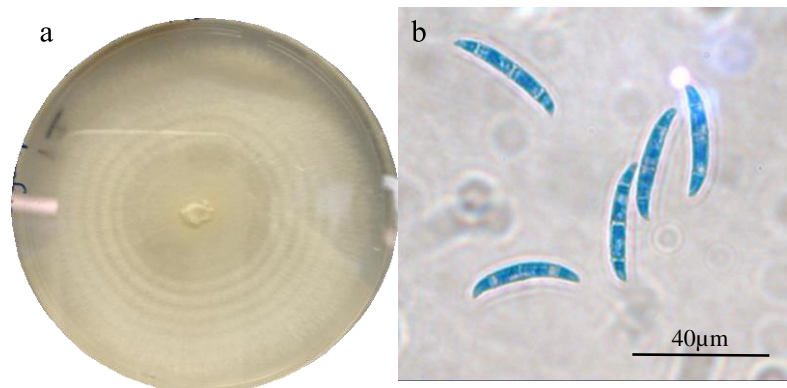


Figura 10: Características morfológicas macroscópicas (a) e microscópicas (b) do fungo associado à podridão na azeitona (fungo F1), após 10 dias de incubação a 20-25°C em meio PDA. (a) Visão superior da colónia fúngica, (b) Morfologia dos esporos (conídios).

A comparação da sequência obtida com aquelas disponibilizadas na base de dados do NCBI (GenBank) revelou que o isolado fúngico F1 analisado apresentava uma percentagem de identidade de 100% com *Neocosmospora solani* (= *Fusarium solani*) na base de dados geral (Nº de acesso MT605584.1) ou de coleções internacionais de espécies-tipo (Nº de acesso NR_154227.1), respetivamente, com um *query cover* de 100%.

Utilizando a sua sequência de ITS, foi realizada uma análise filogenética para uma melhor identificação do isolado F1 e reconhecer qual a sua posição dentro do complexo de espécies anteriormente atribuído a *Fusarium solani* (FSSC), espécies que agora se reconhece pertencerem ao género *Neocosmospora* (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Para a construção da árvore foram também consideradas as sequências (1) dos cinco primeiros resultados do BLAST obtidos para a sequência de F1, (2) as sequências de estirpes-tipo do complexo FSSC,

(3) bem como de outras espécies de *Fusarium* ou de géneros recentemente descritos a partir de *Fusarium* (SANDOVAL-DENIS et al., 2019; SCHROERS et al., 2016). A figura 11 mostra a posição filogenética do isolado F1 e a sua relação com outras espécies do complexo FSSC (i.e., género *Neocosmospora*), claramente suportado por um valor de *bootstrap* de 100. Observa-se que F1 se encontra dentro de um subclado, com suporte de 97, com as duas estirpes-tipo de *Neocosmospora solani* (CBS 140079 e CBS 101018) e com as sequências obtidas pelo resultado do BLAST (aqui identificadas apenas pelo número de acesso do GenBank). Ainda que situado no subclado da espécie *N. solani*, pela divergência evolutiva evidenciada (Fig. 11), e porque se trata de uma árvore obtida com informação de apenas um marcador molecular (CROUS et al., 2021), identificou-se o isolado F1 como *Neocosmospora* aff. *solani*. Para termos a certeza da identificação, será interessante poder investigar futuramente este isolado, e se possível também os isolados filogeneticamente mais próximos (MN094400 e EF534182), através de uma análise multi-locus em que juntará ao ITS informação de outros marcadores. Tal como referido por CROUS et al. (2021), os resultados corroboram a importância de se analisarem sequências de fungos para fins de identificação taxonómica através de filogenias. Por exemplo, a sequência do primeiro resultado do BLAST (MN094400) foi depositada erradamente como *Talaromyces purpureogenus*, uma identificação que não está correta pois este fungo pertence à classe Eurotiomycetes, bem distante da família Nectriaceae, pertencente à classe Sordariomycetes. Estes casos infelizmente são comuns (CROUS et al., 2021), podendo induzir em erro alguém que procure identificar o seu organismo apenas pelo resultado do BLAST. Por esta mesma razão, não se colocou na Figura 11 a descrição da sequência, mas sim apenas os números de acesso do GenBank. Ao mostrar apenas as identificações de estirpes-tipo, cujas sequências são curadas e há confiança na informação depositada no GenBank, evitam-se possíveis confusões taxonómicas (CROUS et al., 2021).

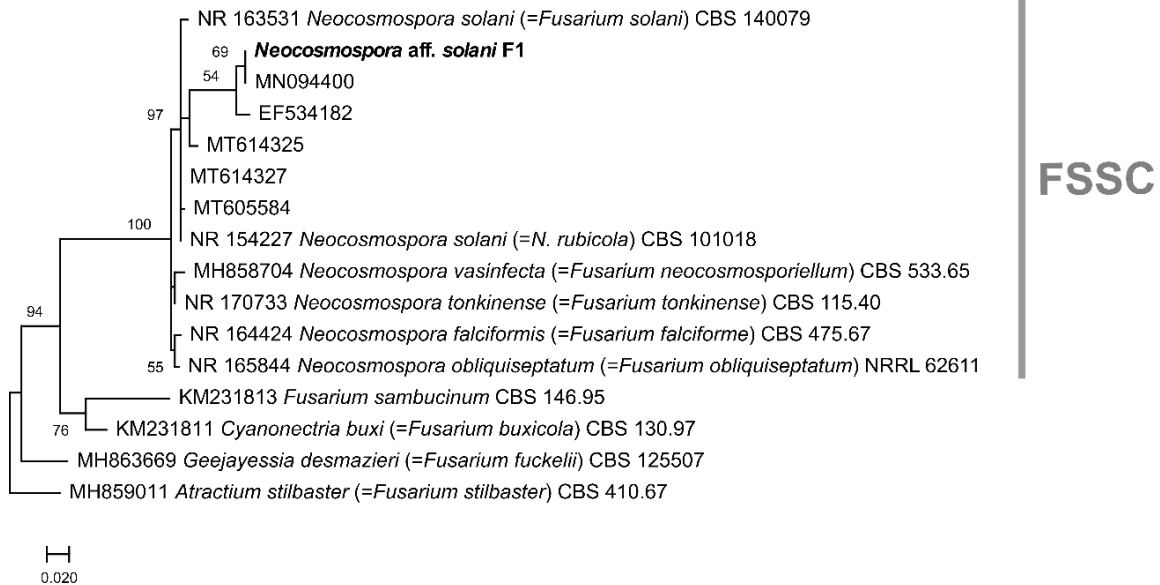


Figura 11: Árvore de Máxima Verosimilhança (- ln L = 2339.08) para sequências de ITS que mostra a relação filogenética do isolado F1 (a negrito) com estirpes-tipo de espécies da família Nectriaceae. Em parênteses estão os sinónimos taxonómicos. A árvore está desenhada à escala, em que o comprimento dos ramos foi medido em termos de número de substituições por posição nucleotídica. São mostrados os números de acesso do GenBank das sequências.

O isolado F1, identificado como sendo *Neocosmospora aff. solani*, foi conservado na coleção de culturas de microrganismos do Centro de Investigação de Montanha (CIMO-CC). A este isolado passou-se a designar doravante por *N. solani*.

4.2. Avaliação da patogenicidade de *Neocosmospora aff. solani*

A espécie *N. solani* tem sido encontrada associada a podridões da azeitona na região de Mirandela, não existindo, porém, informações sobre a sua patogenicidade para a oliveira em Portugal. Assim sendo, procedeu-se à avaliação da patogenicidade do isolado identificado pela aplicação dos postulados de Koch. Este estudo foi efetuado em ensaios de laboratório, pela inoculação de azeitonas, e adicionalmente de campo, pela inoculação de ramos de oliveira em condições controladas, com uma suspensão de *N. solani* a 10^8 conídios/mL. Ao fim de 30 dias de inoculação, verificou-se que a média da percentagem de frutos afetados foi de 64% e 72% nos ensaios de laboratório e de campo, respetivamente (Fig. 12a).

O isolado testado revelou ainda ter elevada severidade ao provocar, em média, lesões até 50% ou 25% da superfície do fruto, em condições laboratoriais ou de campo, respetivamente (Fig. 12b). A maior severidade observada em condições laboratoriais pode estar relacionada

com o maior controlo das condições ambientais, em particular da temperatura e humidade, face às condições de campo. São vários os trabalhos que demonstraram que a severidade bem como o processo infeccioso dos fungos fitopatogénicos é fortemente dependente destes fatores ambientais (SCHWARTZ & GALVEZ, 1980). Dos frutos infetados, foi reisolado o fungo *N. solani* em meio de cultura BDA, e cuja identificação foi confirmada pela análise das características morfológicas macroscópicas e microscópicas das colónias. A recuperação de *N. solani* dos frutos afetados confirmam assim tratar-se do agente causal das podridões observadas na azeitona, dando-se cumprimento aos postulados de Koch.

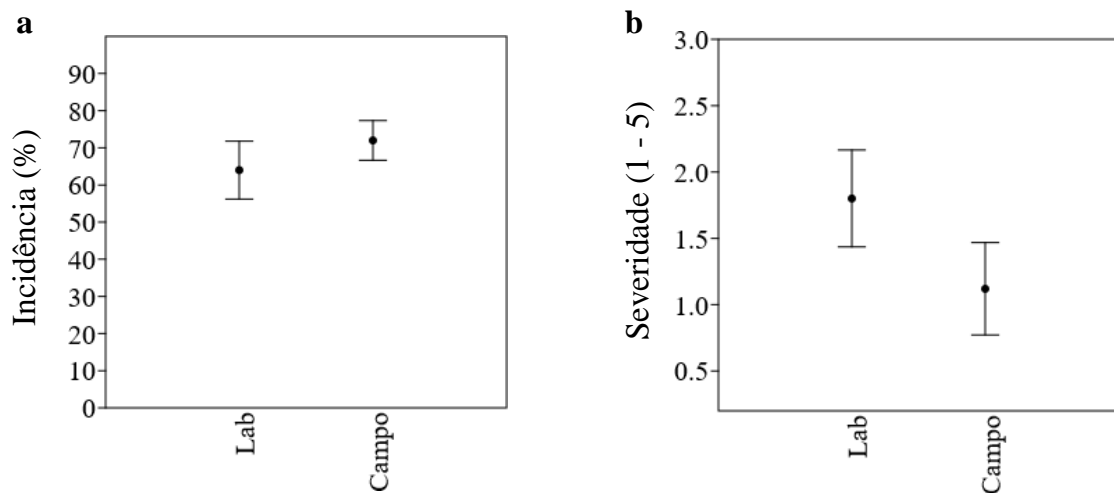


Figura 12: Incidência (a) e severidade (b) da podridão da azeitona causada pelo fungo *Neocosmospora solani* em ensaios laboratoriais (Lab, azeitonas inoculadas) e de campo (Campo, ramos inoculados), ao fim de 30 dias de inoculação. A incidência é expressa em percentagem de frutos infetados e a severidade é expressa numa escala de 1 (frutos com menos de 25% da superfície afetada) até 5 (fruto completamente podre). Os valores representam a média (ponto central) e desvio padrão (barras).

A podridão causada por *N. solani*, manifesta-se sobretudo através do aparecimento de pequenas manchas castanho-escuras, moderadamente deprimidas, em qualquer região do fruto, que se expandem gradualmente sobre toda a superfície do fruto (Fig. 13). Numa fase final, o fruto fica coberto por uma matriz gelatinosa de coloração acastanhada, apresentando um micélio de coloração esbranquiçada a cinza abundante, e com produção de enorme quantidade de esporos.



Figura 13: Sintomatologia causada por *Neocosmospora solani* em azeitonas da cv. Cobrançosa.

Membros do complexo de espécies de *N. solani* (= *Fusarium solani*, que representam mais de 60 espécies) são responsáveis por causar doenças em diversas culturas com importância agrícola (COLEMAN, 2015). A maioria tem sido reportada como sendo responsável por causar podridões nas raízes e caules de ervilheira, soja, feijoeiro, batateira, tomateiro, pimenteiro e várias espécies de Cucurbitaceas (COLEMAN, 2015), mas também em frutos, tais como kiwi (YANG et al., 2018), morango (MEHMOOD et al., 2017), abóbora (CASTROAGUDIN et al., 2009) e maracujá (BUENO et al., 2014). No que concerne à oliveira, são vários os países onde já foi reportado a capacidade de *N. solani* causar a podridão radicular, nomeadamente no Nepal (VETTRAINO et al., 2009), Argentina (PEREZ et al., 2011), Marrocos (CHLIYEH et al., 2017), e mais recentemente no Brasil (DOMINGUES et al., 2020) e Tunísia (GHARBI et al., 2020). Nestes casos, para além de apresentarem podridão radicular, as oliveiras infetadas por *N. solani* apresentam as folhas secas e, em estádios mais avançados, ocorre a morte de ramos e por fim da árvore. Tanto quanto é do nosso conhecimento, a capacidade deste fungo em causar podridões em azeitonas nunca tinha sido reportada. No entanto, é provável que a infeção de frutos por *N. solani* tenha sido já verificado anteriormente noutros países, mas que tenha sido confundido com outras doenças mais vulgares que provocam a podridão dos frutos (e.g., gafa), tal como sugerido anteriormente por MORAL et al. (2017).

4.3. Influência de outros microorganismos colonizadores da azeitona na patogenicidade de *N. solani*

Um melhor conhecimento do efeito das interações que podem ocorrer entre patogênicos e outros microrganismos não patogênicos que cohabitam num mesmo órgão da planta poderá ser importante para o desenvolvimento de meios de luta contra doenças. Estes meios de luta podem atuar diretamente no patogénico pela redução da sua população ou indiretamente pela manipulação dos microrganismos que cooperam positivamente com o patogénico. Em ambos os casos, pode-se recorrer à aplicação de microrganismos antagonistas que reduzam a população do patogénico ou do microrganismo que coopera com o patogénico na promoção do desenvolvimento da doença. Face ao exposto, neste trabalho pretendeu-se avaliar a influência de outras espécies fúngicas vulgarmente presente na polpa de azeitonas na patogenicidade de *N. solani*. As espécies testadas foram a bactéria *Kocuria* sp. e a levedura *Vishniacozyma cf. victoriae*, por terem sido identificadas como sendo as que possuem uma maior frequência de ocorrência e abundância em azeitonas, em estudos prévios do nosso grupo de trabalho (LOPES, 2020). A influência destas duas espécies microbianas no desenvolvimento da podridão na azeitona causada por *N. solani* foi avaliada em condições laboratoriais (ensaios em azeitona) e de campo (ensaios em ramos).

4.3.1. Resultados dos ensaios em laboratório (em azeitonas)

Na Figura 14 encontram-se representadas as áreas sob a curva de progresso da doença nos diferentes tratamentos usando os dados de incidência (ASCPD incidência) e da severidade (ASCPD severidade). Os resultados mostram que as azeitonas inoculadas com meio LB/Tween (controlo negativo) e com as duas espécies microbianas endofíticas (*Kocuria* sp. ou *V. victoriae*), não desenvolveram a sintomatologia típica de podridão causada pela infeção por *N. solani*, durante a realização do ensaio. No entanto, verificou-se que ambas as espécies endófitas originavam umas manchas acastanhadas na superfície da azeitona, mas com características morfológicas diferentes das causadas por *N. solani*. O número de azeitonas que apresentavam estas manchas (incidência) bem como a superfície da azeitona ocupada por estas manchas (severidade) nunca diferiu significativamente do tratamento controlo. Assim, tal como esperado, as duas espécies endófitas testadas parecem não exercer qualquer efeito deletério na azeitona quando aplicadas isoladamente. Porém, quando estas espécies são aplicadas

juntamente com *N. solani*, parecem promover o desenvolvimento da doença causada por este patogénico. De fato, a inoculação de azeitonas com *Kocuria* sp. ou *V. victoriae* juntamente com *N. solani* permitiu aumentar significativamente a incidência (mais de 1,6 vezes, $p < 0,01$) e severidade (mais de 3,1 vezes no caso da *Kocuria* sp., $p < 0,001$; e mais de 1,8 vezes no caso da *V. victoriae*, $p < 0,01$) da doença face ao controlo positivo (azeitonas inoculadas com *N. solani*), em especial após 30 dias de inoculação com *N. solani*. Espécies pertencentes ao género *Kocuria* têm sido descritas como sendo benéficas para a planta ao promoverem o seu crescimento através de vários mecanismos, incluindo a produção de ácido indolacético, aumento de absorção de nutrientes e solubilização de fósforo (GOSWAMI et al., 2014; YE et al., 2020). Algumas espécies deste género têm ainda sido descritas como tendo a capacidade de aumentar a tolerância e a capacidade de extração de metais pesados por parte de plantas colonizadas por estes microrganismos (HUSSAIN et al., 2019). *V. victoriae* é uma espécie cosmopolita, tendo sido reportada como agente de biocontrolo contra podridões causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* em pera (GRAMISCI et al., 2018), bem como estando negativamente associada ao patogénico *Erysiphe necator* responsável por causar o oídio da videira (PAUVERT et al., 2020). No presente estudo, quer a *Kocuria* sp. como a *V. victoriae* tem uma tendência a interagir com *N. solani* regulando o processo de infeção do patogénico e desenvolvimento da podridão da azeitona. Trabalhos recentes, utilizando outros sistemas patogénico-planta, têm reportado resultados similares aos obtidos no nosso estudo (CABALLO-PONCE et al., 2018; PAUVERT et al., 2020). A estas espécies microbianas não-patogénicas que parecem cooperar com o patogénico tornando-o mais agressivo foram designadas por “microrganismos promotores da doença” (PAUVERT et al., 2020). Tanto quanto é do nosso conhecimento esta é a primeira vez que é reportado este efeito para as espécies *Kocuria* sp. e *V. victoriae* no sistema oliveira-*N. solani*.

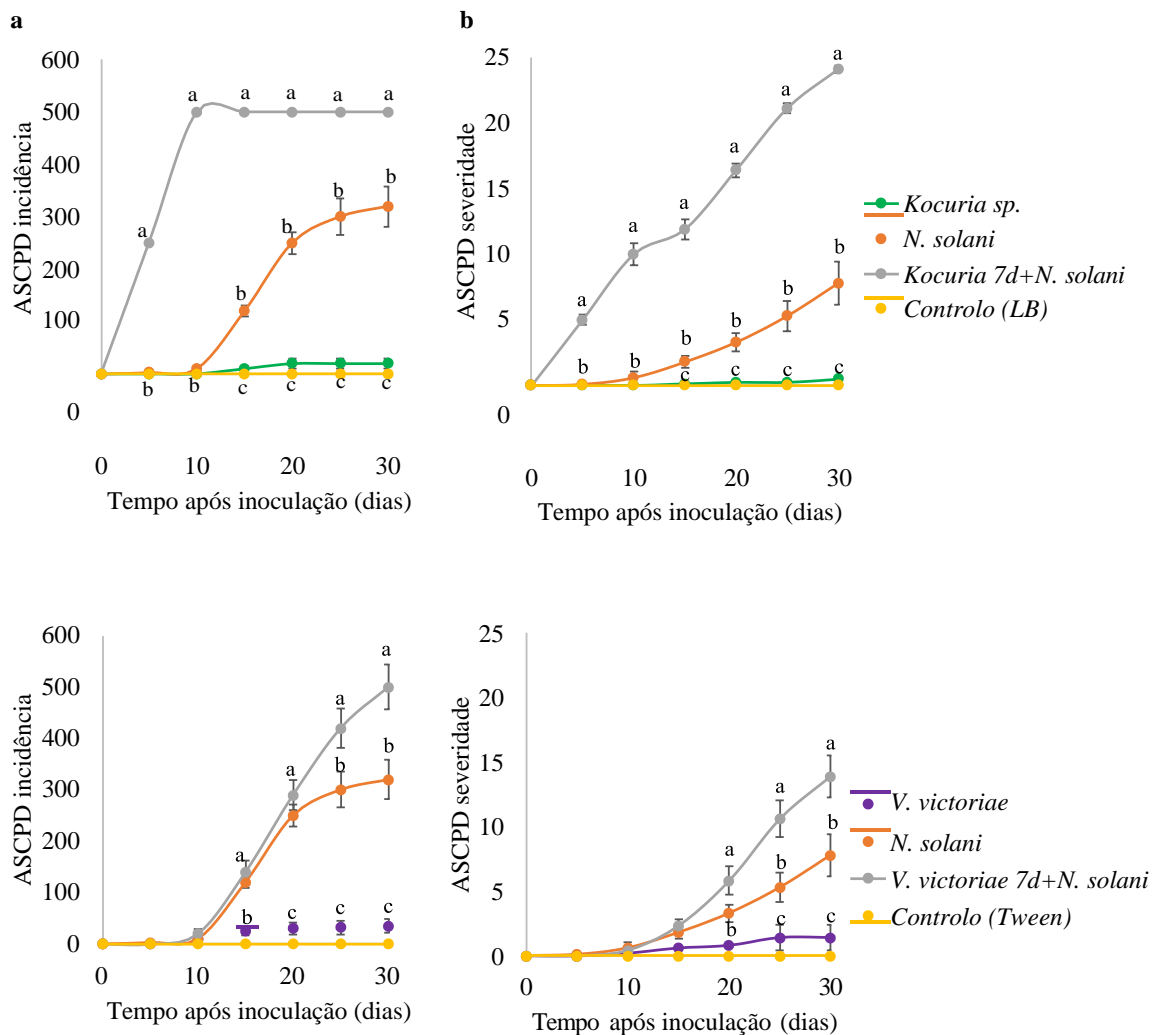


Figura 14: Áreas sob a curva de progresso da doença (podridão da azeitona) em termos da porcentagem de frutos atacados, sua incidência (a) e severidade (b) causada por *Neocosmospora solani* na presença de *Kocuria sp.* ou de *Vishniacozyma cf. victoriae*. Tratamentos: *Kocuria sp.* ou *V. victoriae*- azeitonas inoculadas apenas com estas espécies endófitas; *N. solani*- azeitonas inoculadas apenas com o patógeno; *Kocuria sp.* ou *V. victoriae 7d+N. solani* - azeitonas inoculadas com um dos endófitos e após 7 dias inoculadas com *N. solani*; Controlo- azeitonas inoculadas apenas com meio LB (no caso do ensaio *Kocuria sp.*) ou com Tween (no caso do ensaio com *V. victoriae*). Valores médios registados para cada tratamento seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$, para cada dia analisado.

No final do ensaio (i.e., 30 dias após inoculação das azeitonas com *N. solani*) procedeu-se à avaliação da germinação e esporulação de *N. solani* no controlo positivo (inoculação apenas com *N. solani*) e nos tratamentos que envolveu a inoculação de azeitonas com *Kocuria sp.* ou *V. victoriae* juntamente com *N. solani*. Os resultados obtidos e indicados na Figura 15 mostram que *V. victoriae* reduziu significativamente a germinação de esporos de *N. solani* (em 1,2 vezes, $p < 0,05$) enquanto que a *Kocuria sp.* não teve qualquer efeito na germinação face ao controlo positivo. Este resultado sugere que *V. victoriae* tem a capacidade de reduzir a viabilidade de *N. solani*, apesar das curvas de incidência e severidade da doença (Fig. 14) terem mostrado a existência de uma cooperação entre as duas espécies. No que concerne à esporulação, ambas as

espécies endófitas aumentaram significativamente a quantidade de esporos produzidos por *N. solani* face ao controlo em 1,2 vezes (para *Kocuria* sp., $p < 0,01$) e 1,1 vezes (para *V. victoriae*, $p < 0,05$) (Fig. 15b). Este aumento de esporulação poderá, em parte, explicar a maior agressividade do processo infeccioso de *N. solani* na presença destas duas espécies endófitas. Os mecanismos responsáveis por este efeito devem, no entanto, ser estudados no futuro.

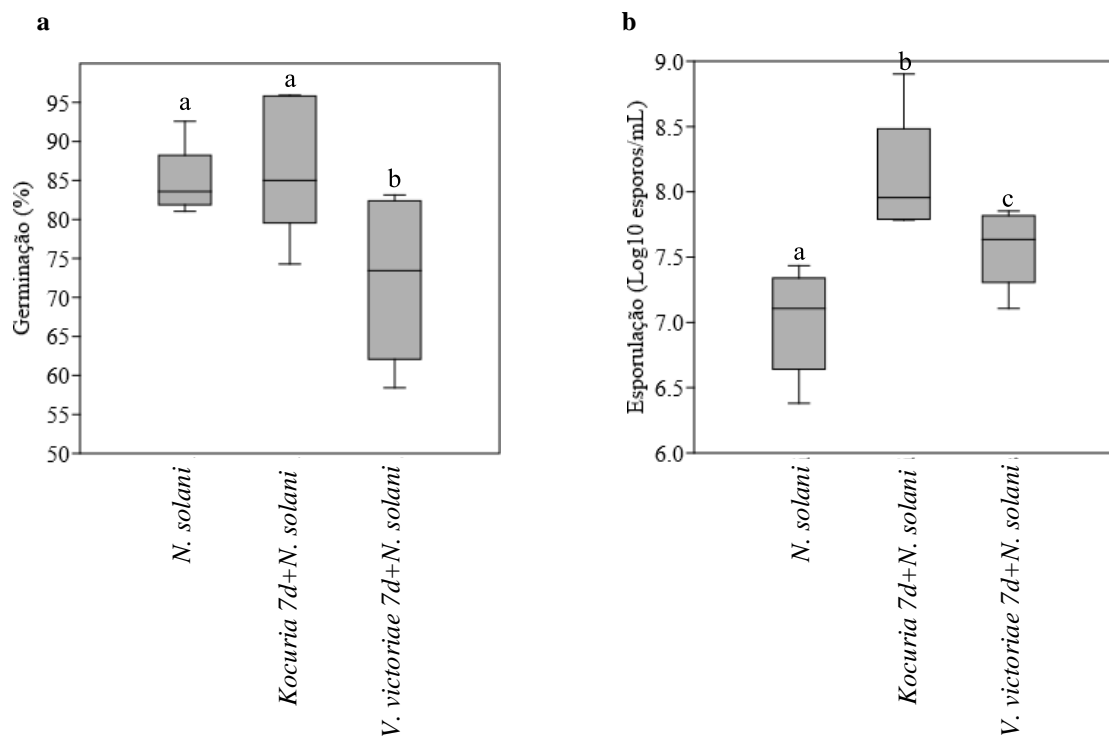


Figura 15: Boxplots, indicando a mediana, os quartis e os valores mínimo e máximo da germinação (a) e esporulação (b) de *Neocosmospora solani* no final do ensaio (30 dias após inoculação das azeitonas) no controlo positivo (*N. solani*) e na presença de *Kocuria* sp. ou de *Vishniacozyma cf. victoriae*. Letras distintas nas barras de cada tratamento diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$.

4.3.2. Resultados dos ensaios em campo

Na Figura 16, encontram-se representadas as áreas sob a curva de progresso da doença nos diferentes tratamentos usando os dados de incidência (ASCPD incidência) e da severidade (ASCPD severidade). Os resultados mostram que as azeitonas que foram pulverizadas com meio LB/Tween (controlo negativo) e com as duas espécies microbianas endófitas (*Kocuria* sp. ou *V. victoriae*), não desenvolveram a sintomatologia típica de podridão causada pela infeção por *N. solani*, durante a realização do ensaio. No entanto, verificou-se que ambas as espécies endófitas originavam manchas acastanhadas na superfície da azeitona, mas com

características morfológicas diferentes das causadas por *N. solani*. O número de azeitonas que apresentavam estas manchas (incidência) bem como a superfície da azeitona ocupada pelas manchas (severidade) não diferiu significativamente do tratamento controlo. Assim, tal como esperado, as duas espécies endofíticas testadas parecem não exercer qualquer efeito deletério na azeitona quando aplicadas isoladamente.

Ao contrário do observado nos ensaios em laboratório, no campo, a pulverização de azeitonas com *Kocuria* sp. juntamente com *N. solani* permitiu reduzir a incidência da podridão (mais de 1,7 vezes), não sendo, contudo, este efeito estatisticamente significativo ($p > 0,05$) face às azeitonas inoculadas apenas com *N. solani* (Fig. 16). De igual modo, a severidade da podridão das azeitonas causada por *N. solani* não foi favorecida pela presença de *Kocuria* sp., ao contrário do observado nos ensaios laboratoriais. Quer a incidência como a severidade da podridão nos ramos inoculados com *Kocuria* sp. + *N. solani* foi significativamente superior face aos ramos controlo (inoculados apenas com LB).

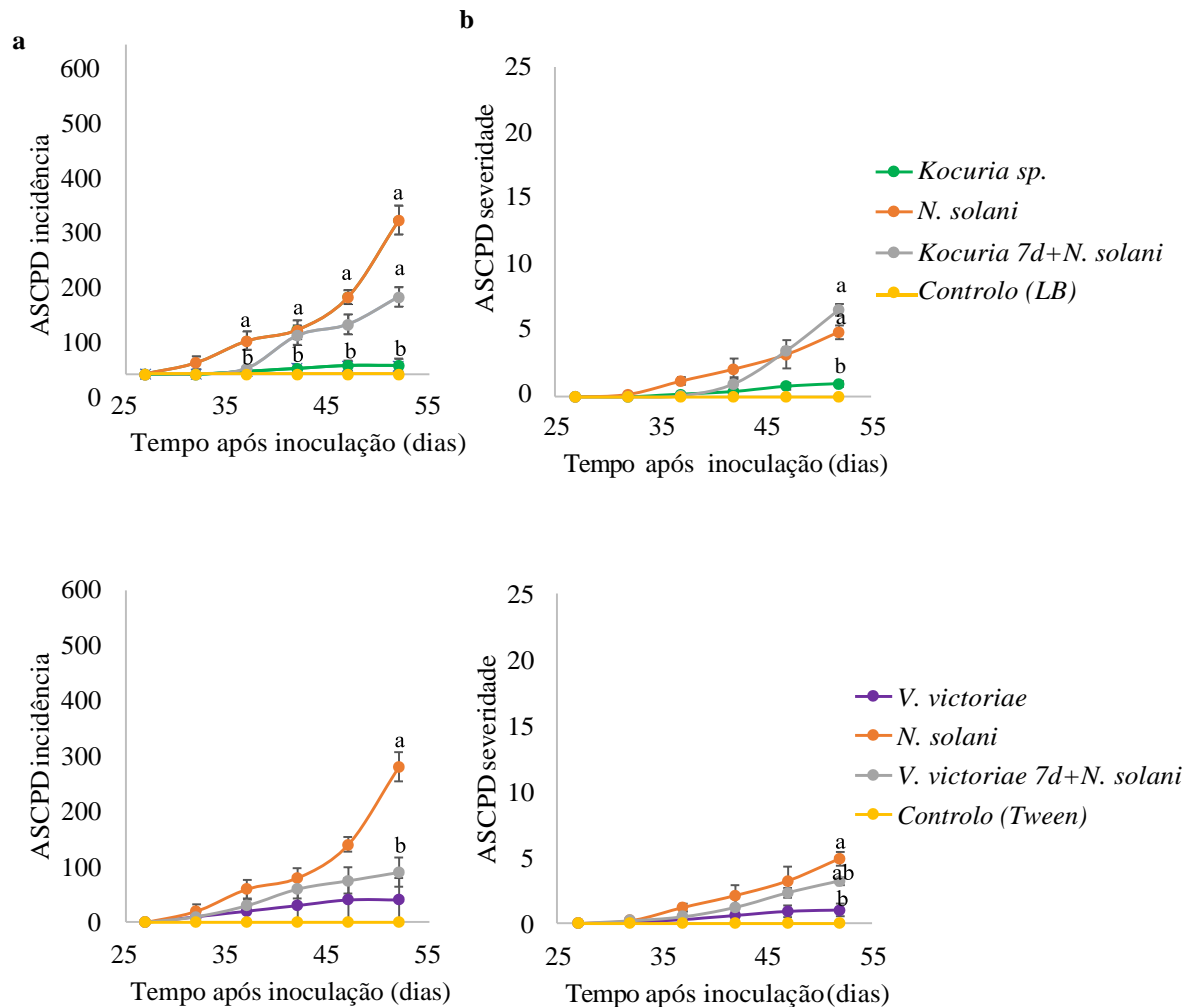


Figura 16: Áreas sob a curva de progresso da doença (podridão da azeitona) em termos da sua incidência (a) e severidade (b) causada por *Neocosmospora solani* na presença de *Kocuria sp.* ou de *Vishniacozyma cf. victoriarum*. Tratamentos: *Kocuria sp.* ou *V. victoriarum*- ramos inoculados apenas com estas espécies endófitas; *N. solani*- ramos inoculados apenas com o patogénico; *Kocuria sp.* ou *V. victoriarum 7d+N. solani* - ramos inoculados com um dos endófitos e após 7 dias inoculados com *N. solani*; Controlo- ramos inoculados apenas com meio LB (no caso do ensaio *Kocuria sp.*) ou com Tween (no caso do ensaio com *V. victoriarum*). Valores médios registados para cada tratamento seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente em pelo menos $p < 0,05$, para cada dia analisado.

No que concerne aos ensaios com *V. victoriarum*, verificou-se que quando aplicado nos ramos juntamente com *N. solani* reduzia significativamente (mais de 3,1 vezes, $p < 0,05$) a incidência da podridão face aos ramos inoculados apenas com *N. solani* (Fig. 16). No entanto, em termos de severidade não se registaram diferenças significativas entre ramos inoculados com *V. victoriarum* + *N. solani* e *N. solani*.

No final do ensaio (i.e., 52 dias após pulverização dos ramos com *N. solani*) procedeu-se à avaliação da germinação e esporulação de *N. solani* no controlo positivo (inoculação apenas com *N. solani*) e nos tratamentos que envolveu a inoculação com *Kocuria sp.* ou *V. victoriarum* juntamente com *N. solani*. Os resultados obtidos e apresentados na Figura 17a mostram que

quer *V. victoriae* como *Kocuria sp.* aumentaram a germinação de *N. solani* em 1,7 vezes e 1,3 vezes, respetivamente face ao controlo (inoculação apenas com *N. solani*), não sendo, contudo, esta diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$). No que concerne à quantidade de esporos produzidos por *N. solani*, verificou-se uma redução na presença de *V. victoriae* (cerca de 1,02 vezes) ou um aumento na presença *Kocuria sp.* (cerca de 0,9 vezes) face ao controlo (inoculação apenas com *N. solani*) (Fig. 17b). No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$).

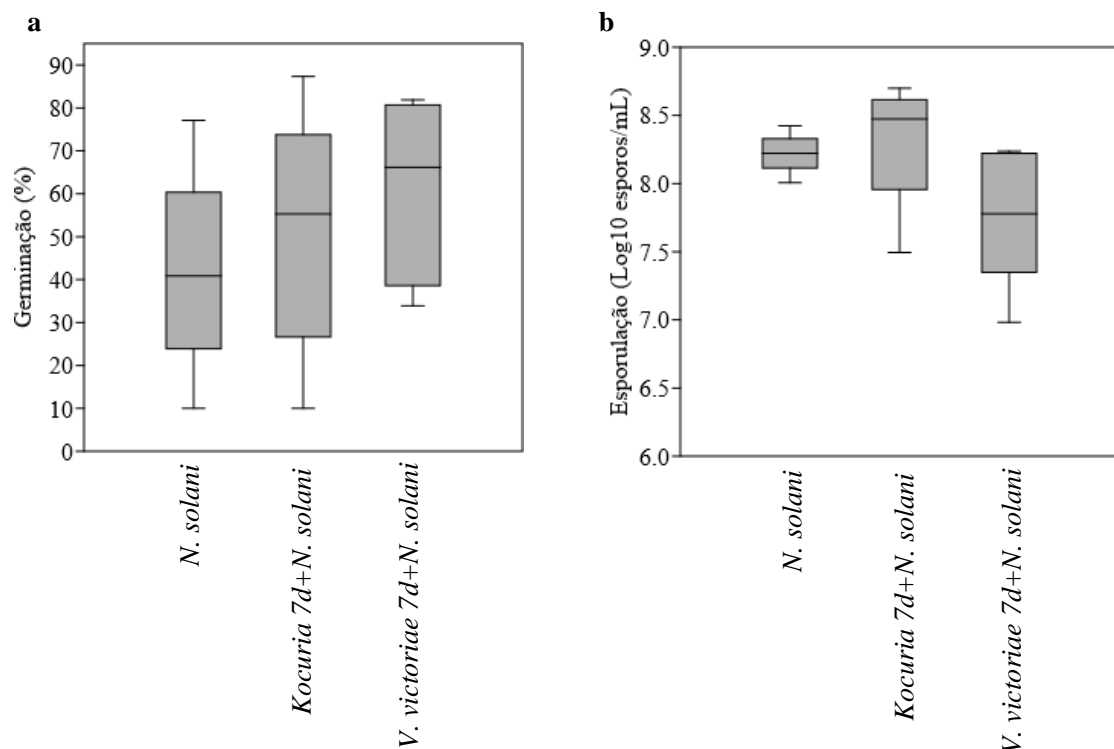


Figura 17: Boxplots, indicando a mediana, os quartis e os valores mínimo e máximo da germinação (a) e esporulação (b) de *Neocosmospora solani* no final do ensaio (52 dias após inoculação dos ramos) no controlo positivo (*N. solani*) e na presença de *Kocuria sp.* ou de *Vishniacozyma cf. victoriae*. Não se registaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ao nível de $p<0,05$.

Tal como já seria expectável verifica-se a inexistência de uma relação entre os resultados obtidos nos ensaios de laboratório e os de campo. Os resultados obtidos em campo traduzem um efeito mais real da interação entre planta-*N. solani*-endófito face aos resultados laboratoriais. Assim, apesar de preliminares, os resultados obtidos em campo sugerem a cooperação da *Kocuria sp.* com *N. solani* no processo do desenvolvimento da podridão dos frutos. Pelo contrário, *V. victoriae*, parece exercer uma ação antagonista contra *N. solani*, sobretudo ao nível do processo infeccioso, por reduzir o número de frutos apodrecidos. Esta

hipótese é corroborada pelos resultados da germinação. O maior efeito inibitório na germinação *N. solani* foi observado na presença de *V. victoriae*. Diferentes compostos/metabolitos podem estar envolvidos na inibição dos fitopatógenos por leveduras, tais como compostos antimicrobianos, toxinas e enzimas, entre outros (EL-MEHALAWY et al., 2004). Esta inibição pode ainda dever-se à competição por espaço e nutrientes entre *V. victoriae* e *N. solani*. Na verdade, as leveduras são reconhecidas por serem excelentes colonizadoras, pois consomem os nutrientes mais rapidamente do que fitopatógenos, evitando o estabelecimento destes e por conseguinte da doença (DROBY et al., 2009). Os mecanismos responsáveis por este efeito devem, entretanto, ser estudados futuramente.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho constitui um pequeno contributo para o estudo de um problema fitossanitário emergente do olival, ao permitir identificar e avaliar a patogenicidade de um isolado fúngico obtido de azeitonas com lesões de podridão. Este isolado foi selecionado de um grupo da mesma morfoespécie e, que exibiam elevada prevalência / ocorrência nos frutos apodrecidos. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar o efeito de duas espécies endofíticas, vulgarmente presentes na polpa da azeitona, no desenvolvimento da podridão por parte do potencial agente causal.

Como conclusões do presente estudo verifica-se que:

1. O isolado fúngico associado à podridão foi identificado como sendo *Neocosmospora aff. solani*. No entanto, esta identificação deverá ser aferida através de um estudo filogenético baseado em mais que um marcador molecular (p.e. genes da tubulina-beta, histona, GADPH, actina). Os restantes isolados da mesma morfoespécie, e existentes na coleção do CIMO, deverão igualmente ser identificados por métodos moleculares.
2. O isolado *N. solani* parece ser o agente causal da podridão da azeitona, com base nos resultados dos postulados de Koch, em ensaios laboratoriais (em azeitonas) e em condições de campo (em ramos de oliveira). Este resultado preliminar necessita de ser corroborado pela avaliação da patogenicidade dos outros isolados da mesma morfoespécie, existentes na coleção do CIMO.
3. As duas espécies microbianas endofíticas (*Kocuria* sp. ou *V. victoriae*) não induziram qualquer efeito deletério na azeitona quando aplicadas isoladamente.
4. O efeito da *Kocuria* sp. ou *V. victoriae* no desenvolvimento da podridão causada por *N. solani* foi contraditória nos ensaios efetuados nas azeitonas e no campo. Este resultado reforça a importância da realização de ensaios de campo para uma melhor compreensão dos efeitos das interações que ocorrem na planta entre o agente patogênico e os microrganismos presentes nesse microecossistema.
5. No geral, os resultados sugerem que a *Kocuria* sp. coopera com *N. solani* para o desenvolvimento da podridão dos frutos, enquanto que *V. victoriae* tende a ter um efeito inibitório reduzindo a incidência da podridão nos ensaios em campo. O papel destas duas espécies endófitas como “promotoras” ou “inibidoras” do desenvolvimento da podridão necessita de ser esclarecido com trabalhos futuros.

6. REFERÊNCIAS

- CABRAL, A; GROENEWALD, J.Z; REGO, C; OLIVEIRA, H; OLIVEIRA and P.W. CROUS
Mycol Prog, 11 (2012), pp. 655-688.
- ÁVILA, A; ROMERO, J; AGUSTÍ-BRISACH, C. et al. **Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora cladosporioides*, causal agent of cercospora leaf spot of olives.** *Eur J Plant Pathol* 156, 45–65 (2020).
- AZEVEDO, João Lúcio; ARAÚJO, Welington Luiz; LACAVA, Paulo Teixeira. **The diversity of citrus endophytic bacteria and their interactions with *Xylella fastidiosa* and host plants.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 4, p. 476–491, 2016.
- BARRANCO, D; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R; RALLO, L; ANDALUSIA, J. **El cultivo del Olivo.** 5ª ed. Mundi-Prensa Libros, 2004.
- BARONCELLI R; TALHINHAS P.; PENSEC F.; SUKNO S.A; LE FLOCH G; THON M;
The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. *Frontiers Microbiology* 8, 2017.
- BARRANCO; FERNANDEZ-ESCOBAR. **El cultivo del olivo.** 6. ed. Madrid: Mundiprensa, 2008.
- BESNARD G., JEAN-FREDERIC T., AMANDINE C. **On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives.** *Annals of Botany* 121:385–403, 2018.
- BRASIER, C.M.; SÁNCHEZ-HERNANDEZ, E.; KIRK, S.A. ***Phytophthora inundata* sp. nov., uma parte heterotállica de árvores e arbustos em solos molhados ou inundados.** *Mycol. Res.* 2003, 107, 477-484.
- BUONAURIO R., MORETTI C., PASSOS DA SILVA D., CORTESE, C., RAMOS, C., VENTURI, V. (2015). **The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant.** *Frontiers in Plant Science*, 6(434): 1–12.
- CABALLO-PONCE, Eloy et al, **Quorum Sensing in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Erwinia toletana*: Role in Virulence and Interspecies Interactions in the Olive Knot.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, n. 18, 2018.
- CACCIOLA S.A; FAEDDA R; SINATRA F; AGOSTEO G.E; SCHENA L; FRISULLO S;
DI SAN LIO M.G. **Olive anthracnose.** *Journal of Plant Pathology* 94: 29-44, 2012.
- CACCIOLA, S.O; SCARITO, G; SALAMONE, A; FODALE, A.S; MULÉ, R; PIRAJNO, G;
SAMMARCO, G. ***Phytophthora* espécies associadas à podridão de raízes de oliva na Sicília.** Em *Processos do IOBC/WPRS, Grupo de Trabalho "Integrado Proteção das Culturas de Oliveira"*, Florença, Itália, 26 a 28 de outubro de 2005.
- CASTORIA, R; DE CURTIS, F; LIMA, G; DE CICCIO, V. **β -1,3- glucanase activity of two saprophytic yeas and possible mode of actions as biocontrol agents against postharvest diseases.** *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.12,p. 293-300, 1997.
- CASTROAGUDIN, V. L; CORRELL, J. C; CARTWRIGHT, R. D. **First Report of Fruit Rot of Pumpkin Caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in Arkansas.** *Plant Disease*, v. 93, n. 6, p. 669–669, 2009.

- CAVALIERI, V; ALTAMURA, G; FUMAROLA, G; DI CAROLO, M; SAPONARI, M; CORNARA, D; BOSCO, D; DONGIOVANNI, C. **Transmission of *Xylella fastidiosa* subspecies *pauca* sequence type 53 by different insect species.** *Insects* 10, 2019.
- PAUVERT, C ; FORT, T ; CALONNEC, A ; D'ARCIER, J.F ; CHANCEREL, E ; MASSOT, M ; CHIQUET, J ; ROBIN, S ; BOHAN, D.A ; VALLANCE, J ; BIORXIV, C.V. **Microbial association networks give relevant insights into plant pathobiomes** 2020.02.21.958033; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.21.958033>.
- CIMATO, A. **Olive nursery production and Plant Production Techniques.** International Olive Council, 2008. Acesso disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/downloads/Projects/index.htm>.
- CLADOSPORIOSE (CLADOSPORIUM SPP. **Cladosporiose (*Cladosporium spp*).** Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/cladosporiose_2754.html>. Acesso em: 8 maio. 2021.
- CLARK, KAREN et al, GenBank, **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D67–D72, 2015.
- COLEMAN; JEFFREY J. **The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance.** *Molecular Plant Pathology*, v. 17, n. 2, p. 146–158, 2015.
- CROUS, P. W; ROSSMAN, A. Y; AIME, C; ALLEN, C; BURGESS, T; GROENEWALD, J. Z; CASTLEBURY, L. (2021). **Names of phytopathogenic fungi: a practical guide.** *Phytopathology*, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-20-0512-PER>.
- C. J. BUENO I. H. FISCHER D. D. ROSA A. C. FIRMINO R. HARAKAVA C. M. G. OLIVEIRA E. L. FURTADO. ***Fusarium solani f. sp. passiflorae: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit.*** *Plant Pathology*, 63(2): 382-389, 2014.
- DECOCK, C; FIGUEROA, S. H; ROBLEDO, G; CASTILLO, G. 2007. **Fomitiporia punctata (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas.** *Mycologia*, 99(5): 733–752.
- DOMSCH, KH; GAMS, W; ANDERSON, TH. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press; 1980.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. **Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?.** *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 52, p. 137-145, 2009.
- EL-MEHALAWY, A. A. **The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*.** *International journal of agriculture e biology*, v. 6, n. 2, p. 310-316, 2004.
- FAHEY, J. W. **Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants.** In: Cutler, H. O. (Ed.) *Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture.* American Chemical Society Symposium Ser, Washington. p.120-128, 1988.
- FAO (Food and Agriculture Association). FAOSTAT; 2019. Acessível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [consultado em 6 de maio de 2021].

- FUNGO DE PÓS COLHEITA (ASPERGILLUS SPP. **Fungo de pós colheita (*Aspergillus spp.*)**. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/fungo-de-pos-colheita_2136.html>. Acesso em: 6 maio. 2021.
- FOURIE, P.H; HALLEEN, F; AND VOLKMANN, A.S. 2000. **Fungi associated with grape wood, root and trunk diseases: A summary of the 1999–2000 results from the diagnostic service at Nietvoorbij**. Page 12 in: Proceedings of the 2nd International Viticulture and Enology Congress, 8–10 November, Cape Town, South Africa.
- FUSARIOSE (FUSARIUM SOLANI. **Fusariose (*Fusarium solani*)**. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/fusariose_1258.html>. Acesso em: 6 maio. 2021.
- GOMES, T; PEREIRA, J.A; LINO-NETO, T; BENNETT, A.E. & BAPTISTA, P. **Bacterial disease induced changes in fungal communities of olive tree twigs depend on host genotype**. Sci. Rep. 9, 5882, 2019.
- GONZALEZ, N; TRAPERO, A. **El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal**. Bol. San. Veg. Plagas 32, pp. 723-737, 2006.
- GOSWAMI, D; PITHWA, S; DHANDHUKIA, P; & THAKKER, J. N. **Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: A novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert**. Journal of Plant Interactions, 9(1), 566–576, 2014.
- GRAMISCI, B. R; LUTZ, M. C; LOPES, C. A; SANGORRÍN, M. P. **Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives**. *Biological Control*, 121, 151–158, 2018.
- HALLMANN, J; QUADT-HALLMANN, A; MAHAFFEE, W. F; KLOEPPER, J. W. **Bacterial endophytes in agricultural crops** *Canadian Journal of Microbiology* Canadian Science Publishing, 1997. DOI: 10.1139/m97-131.
- HANIOTAKIS G.E. **Olive pest control: present status and prospects**. IOBC Bulletin 28: 1–9, 2003.
- HASSANI, M.A; DURÁN, P; HACQUARD, S. **Microbial interactions within the plant holobiont**. *Microbiome* 6, 58, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- HOSNI, T. et al. **Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease**. *ISME J.* 12, 1857-1870 (2011).
- HUSSAIN, A; AMNA; KAMRAN, M. A; JAVED, M. T; HAYAT, K; FAROOQ, M. A; ALI, N; ALI, M; MANGHWAR, H; JAN, F; CHAUDHARY, H. J. **Individual and combinatorial application of *Kocuria rhizophila* and citric acid on phytoextraction of multi-metal contaminated soils by *Glycine max* L**. *Environmental and Experimental Botany*, 159, 23–33, 2019.
- INE - Instituto Nacional de Estatística, 2019. Disponível em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main. Acedido em 1 de maio 2021.

- INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2017. **The Portuguese Olive Sector.** <http://www.oliofficina.net/knowledge/economy/the-portuguese-olive-sector.html>. Consultado em 6 de maio de 2021.
- INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2019. **The Portuguese Olive Sector.** <http://www.oliofficina.net/knowledge/economy/the-portuguese-olive-sector.html>.
- INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2020. **Olive Oil Dashboard** <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/06/IOC-Olive-Oil-Dashboard-June-2020.html#production-2>. Consultado em 6 de maio de 2021.
- JAKUSCHKIN, B., FIEVET, V., SCHWALLER, L., FORT, T., ROBIN, C. & VACHER, C. **Deciphering the pathobiome: intra- and interkingdom interactions involving the pathogen *Erysiphe alphitoides*.** *Microb. Ecol.* **72**, 870–880 (2016).
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M; CIRULLI, M; BUBICI, G; DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M; ANTONIOU, P.P; TJAMOS, E.C. **Verticillium wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management.** *Plant Dis.* 2012, 96, 304–329.
- ROMERO, J; RAYA, M. C; ROCA, L. F; MORAL, J; TRAPERO, A. Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C-4, 14071, Córdoba, Spain.
- KALAITZAKI, A; **Organização Internacional para Controle Biológico e Integrado de Animais e Plantas Nocivas (OIBC/OILB),** Seção Regional Palaearctic Ocidental (WPRS/SROP): Dijon, França, 2007; Volume 30, p. 251.
- KUMAR S; STECHER G; LI M; KNYAZ C; AND TAMURA K. MEGA X: **Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms.** *Molecular Biology and Evolution*. 2018. *Evolution* 35:1547-1549.
- KURBETLI, EU; SULU, G; TASÍ TEKIN, E; POLAT, EU. **Primeiro report de *Phytophthora inundata* declínio em Olivais em Turquia.** *Pode. J. Plant Pathol.* 2016, 38,254-257.
- LARIGNON, P. Black foot disease in France. **Proceedings of the 1998 seminar and workshop on black goo symptoms and occurrence of grape declines.** International Ampelography Society and International Council on Grapevine Trunk Diseases. L. Morton, ed. Fort Valley, Virginia, USA, 1999. Pages 89-90.
- LOPES T. **Temporal dynamics of endophytic microbial communities colonizing olives infested and non-infested by olive fruit fly.** Dissertation presented to the Instituto Politécnico de Bragança, School of Agriculture, for obtaining a Master's degree in Biotechnology Engineering, 66 pp, 2020.
- LÓPEZ-ESCUADERO, F.J; MERCADO-BLANCO, J. **Verticillium wilt of olive: A case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen.** *Plant Soil* 2011, 344, 1–50.
- MAGNANO DI SAN LIO G. **Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose.** *Plant Pathology*, 2014, 63: 437–336.

- MANCHA-FOLIAR (*PHOMOPSIS* SP. **Mancha-foliar (*Phomopsis* sp.)**). Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/mancha-foliar_3172.html>. Acesso em: 8 maio. 2021.
- MARTELLI, G. P; BOSCIA, D; PORCELLI, F; & SAPONARI, M. **The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency**. European Journal of Plant Pathology, 2016, 144, 235–243.
- MORAES, I. O; CAPALBO, D. M; MORAES, R. O. **Multiplicação de agentes de controle biológico**. In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 7-23.
- MORAL JUAN; XAVIÉR CARLOS J; VIRUEGA JOSÉ R; ROCA LUIS F; CABALLERO JUAN; TRAPERO ANTONIO, 2017. **Variability in Susceptibility to Anthracnose in the World Collection of Olive Cultivars of Cordoba (Spain)**. Frontiers in Plant Science 8, 1892.
- MORAL J., DE OLIVEIRA R., TRAPERO A. **Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum***. Phytopathology, 2009, 99:548–556.
- MOVIMENTOS DE PLANTIO DE OLIVEIRAS NO MUNDO**. Disponível em: <<https://blogs.canalrural.com.br/blogdoazeite/2018/02/12/movimentos-de-plantio-de-oliveiras-no-mundo/>>. Acesso em: 8 maio. 2021.
- CHLIYEH, M; MSAIRI, S; OUZZANI TOUHAMI, A; BENKIRANE, R; DOUIRA, A. **Detection of *Fusarium solani* as a Pathogen Causing Root Rot and Wilt Diseases of Young Olive Trees in Morocco**. Annual Research & Review in Biology 13(5): 1-7, 2017.
- M. RAHMAN AND Z.K. **Punja Phytopathology**, 95 (2005), pp. 1381-1390.
- MARTINS F.; PEREIRA J.A; BAPTISTA P. **Olive anthracnose and its management by fungal endophytes: An overview**. In: Varma A., Tripathi S., Prasad R. (Eds) Plant Microbe Interface, Springer Nature Switzerland, 253–270 pp, 2019.
- MONTES-OSUNA, N; MERCADO-BLANCO, J. ***Verticillium* Wilt of Olive and Its Control: What Did We Learn during the Last Decade?** Plants 2020, 9, 735.
- MORAL, J; MUNOZ-DIEZ, C; GONZALEZ, N; TRAPERO, A; MICHAILIDES, T.J. **Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California**. Phytopathology 100, pp. 1340-1351, 2010.
- MORAL, J; XAVIER, C; ROCA L, .F; ROMERO, J; MOREDA, W; TRAPERO A. **La antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite**. Grasas y Aceites 65: e028, 2014.
- MOSCA, S; LI DESTRI NICOSIA, M.G.; CACCIOLA, S.O; SCHENA L. **Molecular analysis of *Colletotrichum* species in the carposphere and phyllosphere of olive**. PLoS One 9: e114031, 2014.
- MORAL, J; MUÑOZ-DÍEZ, C; GONZÁLEZ, N; TRAPERO, A; AND MICHAILIDES, T. J. **Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California**. Phytopathology 100:1340-1351, 2010.

- MARTINS F; PEREIRA J.A; BAPTISTA P. **Olive anthracnose and its management by fungal endophytes: An overview.** In: Varma A., Tripathi S., Prasad R. (Eds) *Plant Microbe Interface*, Springer Nature Switzerland, 253–270 pp, 2019.
- NAVARRETE, F., & DE LA FUENTE, L. (2014). **Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: Decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions.** *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1097–1107.
- NAVERO D.B., ESCOBAR R.F., ROMERO L.R., 2017. **El cultivo del olivo.** 7ª ed., Ediciones Mundiprensa, Madrid (España).
- N. MEHMOOD, A. RIAZ, N. JABEEN, S. ANWAAR, S. Z. HUSSAIN, M. F. ABBAS, X. ZHANG, H. ROSLI, AND M. L. GLEASON, 2017. **First Report of *Fusarium solani* Causing Fruit Rot of Strawberry in Pakistan.** *Plant Disease*, 101, No. 9
- OWNLEY, Bonnie H.; GWINN, Kimberly D.; VEGA, Fernando E. **Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution.** *BioControl*, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 113–128, 2010. DOI: 10.1007/s10526-009-9241-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10526-009-9241-x>.
- PASSOS DA SILVA, D. et al. **Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease.** *Microbiol.* 160, 556-566 (2014).
- PAULUS, E. **Avaliação do crescimento inicial de oliveira “arbequina” em diferentes manejos do solo e dosagens de fósforo.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS, 2011. Disponível em < <http://w3.ufsm.br/ppgcs/images/Dissertacoes/ELOI-PAULUS.pdf>> Acesso em 15 de novembro de 2017.
- PAUVERT, C. et al. **Microbial association networks give relevant insights into plant pathobiomes.** Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339451345_Microbial_association_networks_give_relevant_insights_into_plant_pathobiomes>. Acesso em: 8 maio. 2021.
- PEREIRA, V. L.; OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, V. L.; SOUZA, P. E. **Principais doenças da oliveira: descrição e danos.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 73- 78, mar./abr. 2006.
- PERES A.M., BAPTISTA P., MALHEIRO R., DIAS L.G., BENTO A., PEREIRA J.A., 2011. **Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) using artificial neural networks.** *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 105: 65-73
- PEREZ, B. A.; FARINON, O. M.; BERRETTA, M. F, 2011. **First report of *Fusarium solani* causing root rot of olive in southeastern Argentina.** *Plant Disease* 95 11 1476.
- PONTI L., GUTIERREZ A.P., RUTID P.M., DELL’AQUILA A., 2014. **Fine-scale ecological and economic assessment of climate change on olive in the Mediterranean Basin reveals winners and losers.** *PNAS* 111: 5598–5603.
- QUESADA, J. M., PENYALVER, R., LÓPEZ, M. M. (2012) **Epidemiology and control of plant diseases caused by phytopathogenic bacteria: the case of olive knot disease**

- caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In: Cumagun C. J. (Eds) Plant Pathology. InTech, 299-326 pp.
- QUESADA, J. M., PENYALVERA R., PEREZ-PANADE J., SALCEDO C. I., LOPEZ E. A., (2010). **Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease.** Plant Pathology, 59(2): 262–269.
- ROCA, L.F., MORAL, J., TRAPERO, A., 2007a. **La lepra de la aceituna.** Vida Rural 245, pp. 54-56.
- ROMERO, J.; ÁVILA, A.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; ROCA, L.F.; TRAPERO, A. **Evaluation of Fungicides and Management Strategies against Cercospora Leaf Spot of Olive Caused by *Pseudocercospora cladosporioides*.** Agronomy 2020, 10, 271.
- R.J. DOMINGUES, J.G. TÖFOLI, S. ZANOTA, R. HARAKAVA, 2020. **PRIMEIRA OCORRÊNCIA DE FUSARIUM SOLANI EM OLIVEIRAS CULTIVADAS NO BRASIL.** Biológico, v. 82,19.
- SANDOVAL-DENIS, M., LOMBARD, L., & CROUS, P. W. (2019). **Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*.** Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 43, 90.
- SANHUEZA, R. M. V. **Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, 2000. p. 41-55.
- SANTOS, J. M. (2018). **Turismo de Natureza: Procura Turística e Imagem dos Espaços Naturais.** <https://repositorio.ipv.pt/handle/10400.19/5245>.
- SÁNCHEZ HERNÁNDEZ ME, RUÍZ-DÁVILA A, PÉREZ DE ALGABA A, BLANCO LÓPEZ MA, TRAPERO-CASAS A. **Ocurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain.** Eur J Plant Pathol 1998;104:347–57.
- SCHROERS, H. J., SAMUELS, G. J., ZHANG, N., SHORT, D. P., JUBA, J., & GEISER, D. M. (2016). **Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex.** Mycologia, 108(4), 806-819.
- SECA DE PONTEIROS (PHOMA COSTARICENSIS. **Seca de ponteiros (Phoma costaricensis).** Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/seca-de-ponteiros_1664.html>. Acesso em: 9 maio. 2021.
- SILVA, HARLLEN SA; BETTIOL, WAGNER. **Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento.** Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE), 2009.
- Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*18(4): 382-385. Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew.*Science*, 260: 214-216.

- Strobel, G. A.; Miller, R. V.; Martinez-miller, C.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B.; Hess, W. M. 1999. **Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology*. 17: 417-423.**
- S. ROONEY-LATHAM, L. L. GALLEGOS, P. M. VOSSEN, AND W. D. GUBLER ROONEY-LATHAM, S., ET AL. **First Report of *Neofabraea alba* Causing Fruit Spot on Olive in North America**. 2013. *Plant Dis.* 97:1384.
- SAPONARI, M., BOSCIA, D., NIGRO, F., MARTELLI, G.P., 2013. **Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy)**. *J. Plant Pathol.*
- SILVA DA V., 2016. **Olive anthracnose: passive defense of tolerant and susceptible Portuguese *Olea europaea* L. cultivars and its effect on olive oil quality**. Tese de Mestrado, Escola Superior Agrária de Bragança.
- SCHENA L., MOSCA S, CACCIOLA S.O., FAEDDA R., SANZANI S.M., AGOSTEOG.E., SERGEEVA V., TALHINHAS P., NEVES-MARTINS J., OLIVEIRA H., SREENIVASAPRASAD S., 2009. **The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hot spot**. *FEMS Microbiology Letters* 296:31-38.
- SU, C.J., SUN, J., ZHU, W. & PENG, L. 2018 **History, distribution, and potential of the olive industry in China: A Review Sustainability** 10 1426 doi: 10.3390/su1005142.
- TEIXEIRA, I.; TÉCNICO, C.; ALIMENTOS, E. **Microbiologia dos Alimentos**. [s.l.] , [s.d.]. Disponível em: <http://pronatec.ifpr.edu.br/wp-content/uploads/2013/06/Microbiologia_dos_Alimentos.pdf>.
- TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. ***Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas**. *O Biológico*, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.
- Talhinhas P., Loureiro A., Oliveira H., 2018. **Olive anthracnose: a yield- and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence host preference and geographical distribution**. *Molecular Plant Pathology* 19: 1797-1807
- TALHINHAS P., MOTA-CAPITÃO C., MARTINS S., RAMOS A.P, NEVES-MARTINS J., GUERRA-GUIMARÃES L., VÁRZEA V., SILVA M.C., SREENIVASAPRASAD S., OLIVEIRA H., 2011. **Epidemiology histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal**. *Plant Pathology* 60: 483-495.
- TOUS, J., ROMERO, A., HERMOSO, J. F. (2010) **New trends in olive orchard design for continuous mechanical harvesting**. *Advances in Horticultural Science* 24, 43-52.
- TRAPERO, A., LÓPEZ DONCEL, L.M., 2005. **Resistencia y susceptibilidad al Repilo**. En: Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J., Del Río, C., Martín, A, Tous, J., Trujillo, I. (Eds.). *Variedades de olivo en España*. Coedición Junta de Andalucía / MAPA / Mundi-Prensa, Madrid, pp. 323-328.
- TRAPERO-CASAS A, ROCA LF, MORAL J, LÓPEZ ESCUDERO FJ, BLANCO LÓPEZ MA (2009). **Enfermedades del olivo**. *Phytoma España* 209, 18-28.

- TOUS, J., ROMERO, A., HERMOSO, J. F. (2010) **New trends in olive orchard design for continuous mechanical harvesting.** *Advances in Horticultural Science* 24, 43-52
- VAYSSIER-TAUSSAT M. *et al.* **Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics.** *Front Cell Infect. Microbiol.* **4**, 1-7 (2014).
- VETTRAINO AM, SHRESTHA GP, VANNINI A., 2009. **First Report of Fusarium solani Causing Wilt of Olea europaea in Nepal.** *Plant Dis.* 93(2):200. doi: 10.1094/PDIS-93-2-0200A.
- VIRUEGA JR, MORAL J, ROCA LF, NAVARRO N, TRAPERO A (2013). **Spilocaea oleagina in Olive Groves of Southern Spain: Survival, Inoculum Production, and Dispersal.** *The American Phytopathological Society*, 97(12):1549-1556.
- WILSON, D. **Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition.** *Oikos*, v. 73, n. 2, p. 274–276, 1995. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3545919>
- YAAKOUB GHARBI, EMNA BOUAZIZI, MANEL CHEFFI, FATHI BEN AMAR & MOHAMED ALI TRIKI. **Investigation of soil-borne fungi, causal agents of olive trees wilt and dieback in Tunisia,** *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53:17-18, 828-843, 2020.
- YE, D., LI, T., LIU, J. *et al.* **Characteristics of endophytic bacteria from Polygonum hydropiper and their use in enhancing P-phytoextraction.** *Plant Soil* 448, 647–663, 2020.