

## **IDENTIFICAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COM POTENCIAL NO CONTROLO DA TUBERCULOSE DA OLIVEIRA**

**Maíra Gabriela Almeida da Costa**

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

Orientação

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Cristina dos Santos Baptista - IPB**

Coorientação

**Ms. Cristina Sofia Lopes Cameirão - IPB**

**Prof. Dr. Gilmar Antônio Nava – UTFPR**

**Bragança**

**2022**

MAÍRA GABRIELA ALMEIDA DA COSTA

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL NO  
CONTROLO DA TUBERCULOSE DA OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Graude Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Cristina dos Santos Baptista

Coorientadores: Ms. Cristina Sofia Lopes Cameirão

Prof. Dr. Gilmar Antônio Nava

BRAGANÇA

2022

Este trabalho é financiado por fundos FEDER através do programa COMPETE (Programa Operacional Fatores de Competitividade), por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, e Europeus (Horizon 2020) através do projeto PRIMA/0002/2018 (INTOMED - Innovative tools to combat crop pests in the Mediterranean).



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



*Á minha vó,*  
*Á minha mãe,*  
*Á minha tia,*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, saúde e discernimento. Agradeço por guiar minhas escolhas, iluminar meus passos para chegar até aqui.

A minha vó Lúcia e minha mãe Maria Edirlene, pelo amor, carinho, esforço e apoio que me deram para eu realizar meus sonhos durante todo esse tempo.

Agradeço a minha tia Clélia, e minha prima Renata por terem me incentivado diversas vezes durante todos os meus anos como estudante, me ouvindo e me acalmando nos momentos de desespero.

Agradeço aos amigos do Brasil, aos meus amigos de longa data e aos que conquistei em Portugal, vocês foram essenciais e levo-os em meu coração e sou muito grata pela amizade de vocês.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Baptista e aos coorientadores, Ms. Cristina Cameirão e Prof. Dr. Gilmar Nava pelos conselhos, orientação, disponibilidade e conhecimento partilhado durante a realização desta dissertação.

Ao Instituto Politécnico de Bragança e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de realizar o programa de dupla diplomação e poder realizar esta dissertação.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e continuam a contribuir para minha formação acadêmica e a progredir. Muito obrigada!

## Resumo

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*) é a bactéria patogénica causal da doença tuberculose-da-oliveira, sendo uma das principais responsáveis pelas perdas significativas na produção e qualidade do olival em todo o mundo especialmente em países do Mediterrâneo. O seu ataque na oliveira ocorre na parte aérea, formando nódulos visíveis no tronco, caule, folhas e frutos, não existindo um tratamento específico e eficaz quando estabelecida no olival. Ocasionalmente a necessidade no desenvolvimento de ferramentas inovadoras, seguras e eficazes para o seu controlo. Assim, neste trabalho pretendeu-se identificar bacteriófagos com potencial de serem usados contra a tuberculose. Devido à elevada especificidade dos fagos, procedeu-se numa primeira fase ao estudo da comunidade bacteriana endofítica associada a tumores e a ramos de oliveira sem sintomas com o intuito de constituir uma coleção de estirpes de *Pss* que será útil no processo de seleção de bacteriófagos. O isolamento em cultura seguida pela identificação dos isolados bacterianos através da sequenciação da região 16S do rDNA permitiu identificar um total de 69 taxa, sendo *Pantoea* e *Erwinia* os géneros mais abundantes em caules assintomáticos, tendo destaque nos sintomáticos os géneros *Pantoea* e *Curtobacterium*. O método por maceração gerou uma maior diversidade taxonómica que no método de explante, sendo nos caules sintomáticos que verificou maior diversidade e abundância bacteriana relativamente aos caules assintomáticos. O isolamento de bacteriófagos em amostras de solo de olival permitiu identificar, pela primeira vez, um total de nove bacteriófagos com capacidade de causar a lise de *Pss*. A sua ação na luta contra a tuberculose deverá ser avaliada no futuro com ensaios *in planta*. Quando avaliada a eficiência dos bacteriófagos contra a *Pss* em fatias de cenoura biológica, não se obteve diferenças significativas, no entanto os resultados obtidos sugerem que os bacteriófagos podem ser considerados possíveis agentes de biocontrolo contra a multiplicação do patógeno, necessitando, porém, de estudos complementares.

Palavra-chave: agentes de biocontrolo, *Olea europaea* L., endófitos, *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, bacteriófagos.

## Abstract

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*) is a pathogenic bacterium that causes olive knot, being one of the main responsible for the significant loss in the production and quality of olive groves worldwide, especially in Mediterranean countries. The attack on the olive tree occurs in the aerial part, forming visible nodules on the trunk, stem, leaves and fruits, and there is no specific and effective treatment when established in the olive grove. Causing the development of innovative, safe and effective tools for its control. Thus, this work aimed to identify bacteriophages with the potential to be used against tuberculosis. Due to the high specificity of the phages, the study of the endophytic bacterial community associated with tumors and symptomless olive branches was carried out in a first phase, with the aim of constituting a collection of *Pss* strains that will be useful in the bacteriophage selection process. The isolation in culture followed by the identification of bacterial isolates through the sequencing of the 16S region of the rDNA allowed the identification of a total of 69 taxa, with *Pantoea* and *Erwinia* being the most abundant genera in asymptomatic stems, with emphasis on the symptomatic genera *Pantoea* and *Curtobacterium*. The maceration method generated a greater taxonomic diversity than the explant method, and the symptomatic stems showed greater bacterial diversity and abundance than the asymptomatic stems. The isolation of bacteriophages in olive grove soil samples allowed the identification, for the first time, of a total of nine bacteriophages capable of causing *Pss* lysis. Its action in the fight against tuberculosis should be evaluated in the future with *in plant* test. When evaluating the efficiency of bacteriophages against *Pss* in slices of biological carrot, no significant differences were obtained, however the results obtained suggest that bacteriophages can be considered possible biocontrol agents against the multiplication of the pathogen, requiring, however, additional studies.

Keywords: biocontrol agents, *Olea europaea* L., endophytes, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, bacteriophages.

## Índice

1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 A OLIVEIRA: Descrição botânica, distribuição e produção .....	16
2.2 FATORES LIMITATIVOS DA PRODUÇÃO: o exemplo da Tuberculose .....	17
2.3. Meios de proteção contra a tuberculose: o exemplo do controlo biológico .....	20
2.4 Bacteriófagos e seu potencial na proteção de plantas contra doenças.....	22
2.5. Isolamento e desenvolvimento de consórcios fágicos na proteção de plantas ....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Recolha de ramos de oliveira para isolamento de bactérias .....	26
3.2 Isolamento Bacteriano .....	27
3.3 Identificação bacteriana.....	28
3.4 Diversidade e análise da comunidade bacteriana .....	31
3.5 Amostragem de solo para isolamento de bacteriófagos .....	32
3.6 Isolamento dos bacteriófagos das amostras de solo .....	32
3.7 Purificação dos bacteriófagos .....	33
3.8 Efeitos dos fagos no controlo de <i>P. savastanoi pv. savastanoi</i> .....	34
4. RESULTADOS .....	36
4.1 Comunidade bacteriana endófito .....	36
4.2 Comparação entre técnicas de isolamento e material vegetal na diversidade bacteriana.....	39
4.3 Isolamento de bacteriófagos .....	44
4.4 Eficiência do bacteriófago no controlo de <i>P. savastanoi pv. savastanoi</i> .....	45
5. DISCUSSÕES .....	48
5.1 Comunidade bacteriana endófito .....	48
5.2 Isolamento bacteriófago e sua eficiência no controlo da tuberculose .....	50
6. CONCLUSÕES .....	53

7. REFERÊNCIAS .....	54
8. ANEXOS .....	71

## **Índice de tabelas**

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do DNA bacteriano. ....	30
Tabela 2. Reagentes e respectivas concentrações utilizados para uma reação de PCR de 20 $\mu$ L. ....	30
Tabela S 1. Resultados do BLAST para os isolados em estudo. ....	72
Tabela S 2. Classificação dos isolados obtidos a partir de amostras endofíticas de ramos saudáveis de oliveira e nódulos causados pela doença tuberculose-da-oliveira. ....	78
Tabela S 3. Análise da similaridade (ANOSIM) baseada na distância de Bray-Curtis da composição bacteriana obtida pelo método de isolamento por maceração e explante, de nódulos (sintomático) e de caule sem sintomas (assintomático). ....	82

## Índice de figuras

Figura 1. Proporção de produção de azeitona por região no mundo (FAOSTAT, 2022). .....	17
Figura 2. Sintomas típicos de Tuberculose da oliveira causados pela bactéria <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ( <i>Pss</i> ) em ramos de oliveira. ....	18
Figura 3. Morfologia e genoma (tipos de genoma e tamanho) de várias famílias de bacteriófagos. A cor azul indica capsídeos (capa proteica protetora), o vermelho indica a cauda do virião e o amarelo refere-se a lípidos. Fonte: adaptado de Hyman e Abedon (2012). ....	23
Figura 4. Parcela de olival selecionado para amostragem de ramos de oliveira Fonte: Google Earth Pro (2015). ....	26
Figura 5. Oliveira centenária selecionada para amostragem de onde foram retiradas amostras de ramos com nódulos e sem nódulos (A); Ramo de oliveira com sintomas de doença (nódulos) (B) e ramo sem sintoma da doença (saudável) (C). ....	27
Figura 6. Ramos saudáveis de oliveira (A); Nódulo de tuberculose da oliveira (B); Placas de Petri com meio PCA contendo as cinco partes de ramos/nódulos distribuídas (C)...	28
Figura 7. Extração de DNA e criopreservação de isolado bacteriano puro. Placa com bactéria pura (A); massa microbiana de colónia em microtubo com solução de extração qual posteriormente vai ao termociclador MyCycler (B); e massa microbiana em tubo de criopreservação com glicerol 30% (v/v) para armazenamento em -80°C (C).....	29
Figura 8. Recolha do solo realizada com o auxílio do trado. ....	32
Figura 9. Escala descritiva para avaliar severidade da tuberculose da oliveira em fatias de cenoura: 0- sem qualquer sintoma da doença; 1- ligeiro escurecimento ao redor do centro; 2- Escurecimento destacado ao redor do centro; 3- Escurecimento ao redor do centro e ligeira formação de nó; 4- formação de nó mais denso e 5-Necrose central.....	35
Figura 10. Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro General Time Reversible (G+I) e teste de bootstrap com 1000	

repetições das sequências do gene 16S rRNA, dos isolados de ramos saudáveis e de nódulos com sintomas da doença tuberculose da oliveira. ....	37
Figura 11. Árvore filogenética do género <i>Pseudomonas</i> com sequências obtidas da região 16S do rRNA, determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Tamura Nei (G+I) e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências dos isolados de ramos saudáveis e de nódulos da oliveira. ....	38
Figura 12. Árvore filogenética do género <i>Pseudomonas</i> com sequências obtidas do gene <i>iaaL</i> , determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Tamura Nei (G) e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências dos isolados de ramos saudáveis e de nódulos da oliveira. ....	39
Figura 13. Gráfico Krona representando a abundância em cada nível taxonómico, desde o filo até ao género, das comunidades bacterianas obtidas pelo método de isolamento por explante.....	40
Figura 14. Gráfico Krona representando a abundância em cada nível taxonómico, desde o filo até ao género, das comunidades bacterianas obtidas pelo método de isolamento por maceração. ....	41
Figura 15. Gráficos Boxplot com os valores de diversidade (A e B) e abundância (C e D) da comunidade bacteriana associada aos nódulos (Sint) e caules sem sintomas (Assint) obtida pela técnica de isolamento por explante (Expl) e macerado (Mac). A linha horizontal representa a mediana, a caixa o intervalo interquartil e as linhas verticais os valores extremos, respetivamente. As barras com letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre nódulos e caules sem sintomas na técnica de explante (letras maiúsculas) ou do macerado (letras minúsculas).....	42
Figura 16. Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) da comunidade bacteriana associada aos nódulos (Sint) e caules sem sintomas (Assint) obtida pela técnica de isolamento por explante (Expl) e macerado (Mac). Esta análise foi efetuada usando o coeficiente de Bray-Curtis. Os valores de Krustal stresse inferiores a 0,2 correspondem a uma boa ordenação, a duas dimensões. ....	43

Figura 17. Abundância relativa (%) dos gêneros de bactérias presentes nos nódulos (Sint) e caules sem sintomas (Assint) obtida pela técnica de isolamento por explante (Expl) e macerado (Mac), bem como o total (Total).....	44
Figura 18. Placas de lise em culturas de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> mostrando a presença de vários bacteriófagos isolados do solo do olival (a) e, de uma cultura pura de bacteriófago da diluição $10^{-5}$ (b). .....	45
Figura 19. Comparação entre fatias de cenoura após 15 dias. Controlo sem inoculação de <i>Pss</i> (a); inoculação somente com bactéria <i>Pss</i> (b).....	46
Figura 20. Gráficos Boxplot de análise dos diferentes tratamentos usando os dados da incidência (AUDPCi), das amostras <i>Pss</i> (Inoculação somente com <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ) e <i>Pss+B</i> (Inoculação com <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> mais bacteriófago) no dia 15 e no dia 30. As letras são usadas para indicar as diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ), entre <i>Pss</i> 15 e <i>Pss+B</i> 15 (Dia 15 - letras maiúsculas) ou <i>Pss</i> 30 e <i>Pss+B</i> 30 (Dia 30 -letras minúsculas). .....	46
<b>Figura 21.</b> Gráficos Boxplot de análise dos diferentes tratamentos usando os dados da severidade (AUDPCs), das amostras <i>Pss</i> (Inoculação somente com <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ) e <i>Pss+B</i> (Inoculação com <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> mais bacteriófago) no dia 15 e no dia 30. As letras são usadas para indicar as diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ), entre <i>Pss</i> 15 e <i>Pss+B</i> 15 (Dia 15 - letras maiúsculas) ou <i>Pss</i> 30 e <i>Pss+B</i> 30 (Dia 30 -letras minúsculas). .....	47

## 1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

A tuberculose ou ronha da oliveira (*Olea europaea L.*) é causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi (Pss)*, e é considerada uma das doenças mais importantes do olival a nível mundial (Valverde et al., 2020; Young, 2004). Nos últimos anos, o impacto económico desta doença tem aumentado drasticamente, principalmente devido à intensificação do cultivo da oliveira que favorece a infeção e disseminação do patógeno (Tous et al., 2010). A infeção por *Pss* 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 (Ramos et al., 2012).

Medidas preventivas através da aplicação de produtos à base de cobre, são geralmente recomendadas para o controlo da doença (Ramos et al., 2012). Porém, para além de exibirem reduzida eficácia contra esta doença, o uso contínuo destes produtos tem originado efeitos adversos ao meio ambiente e a um aumento da resistência de *Pss* ao cobre (Sundin & Wang, 2018; Nguyen et al., 2018a). Uma hipótese para diminuir estes problemas, é através do uso de produtos de base biológica, que oferecem uma abordagem mais ecológica e direcionada para combater o patógeno.

Nos últimos anos, os bacteriófagos (ou resumidamente fagos) têm tido um interesse crescente no controlo de doenças bacterianas em diversas espécies de plantas (Buttimer et al., 2017; Koskella & Taylor, 2018), principalmente devido ao seu elevado grau de especificidade com o hospedeiro (Buttimer et al., 2017; Holtappels et al., 2021). Os fagos são vírus que infetam e se replicam apenas dentro de bactérias hospedeiras específicas (Grace et al., 2021). No entanto, até à data não foram reportados estudos relativos à sua exploração contra o agente causal da tuberculose da oliveira.

- 1- Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral isolar e selecionar fagos com potencial de serem usados na luta contra a tuberculose da oliveira (terapia fágica). Devido à elevada especificidade dos fagos para com o seu hospedeiro, procedeu-se numa primeira fase ao estudo da comunidade bacteriana endofítica associada a tumores e a ramos de oliveira sem sintomas de tuberculose com o intuito de constituir uma coleção de estirpes de *Pss*. Esta coleção foi fundamental para a segunda fase do trabalho, tendo estas estirpes sido utilizadas quer no isolamento como na seleção de fagos com atividade lítica contra este patogénico. Apesar de preliminar, espera-se que o trabalho realizado possa

contribuir para o desenvolvimento de um novo meio de luta contra a tuberculose através da terapia fágica que, tanto quanto se sabe, nunca foi explorado até ao momento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

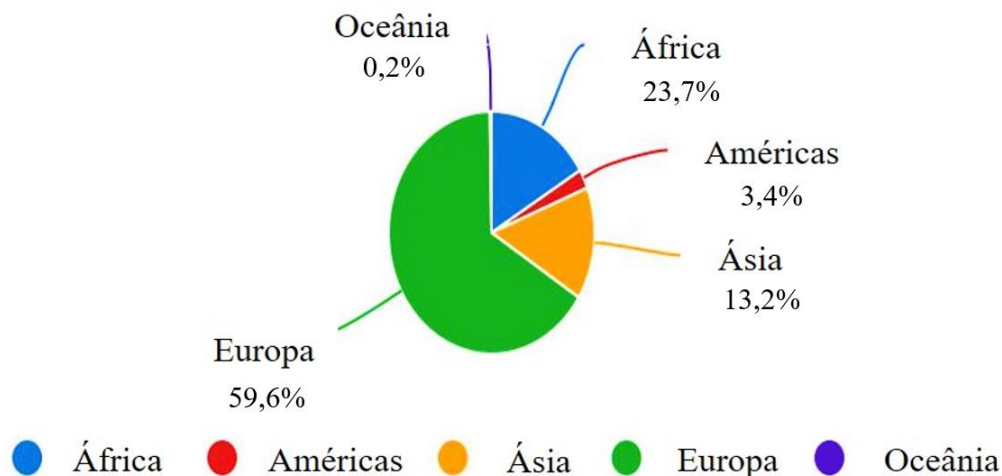
### 2.1 A OLIVEIRA: Descrição botânica, distribuição e produção

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie pertencente à família Oleaceae, composta por 25 géneros e 600 espécies (Dong et al., 2022). Em particular, o género *Olea* compreende 30 espécies (Bracci et al., 2011), sendo a oliveira a espécie mais popular e a única usada como fonte de alimento. Segundo Böhm (2013), *Olea europaea* L originou-se da domesticação da *Olea sylvestris* (oliveiras selvagens - Zambujeiro).

A oliveira é uma planta polimórfica, de porte médio com 4-8 metros de altura, com copa densa, sistema radicular profundo, crescimento lento e grande longevidade (Bohm, 2013). O fruto, azeitona, possui dimensões de 1-4 cm de comprimento e 0,6-2 cm de diâmetro, encontrando-se no seu interior uma semente (caroço) (Barranco et al., 2008). Os ciclos vegetativos e reprodutivos da oliveira diferem no tempo necessário para se completarem, sendo o primeiro de carácter anual e o segundo bienal (Barranco et al., 2017). O frio é um fator promotor da indução floral, pelo que é muito importante no desenvolvimento da oliveira (Fabbri & Benelli, 2000).

Esta árvore é moderadamente resistente a temperaturas baixas. Porém quando se atingem temperaturas entre -5 °C e -10 °C pode ocorrer a morte dos ramos do ano e abaixo de -10 °C verifica-se a morte da própria árvore (Barranco et al., 2017). Contudo, esta espécie (*Olea europaea* L.) é muito tolerante à secura tendo um limite inferior de precipitação anual cerca dos 350 mm, estando idealmente situado entre os 800 a 1000 mm (olivais de sequeiro), sendo que o mínimo aceitável é de 400 mm anuais, para que se consiga uma produção rentável (Ponti et al., 2014; Garcia, 2005).

O cultivo da oliveira é feito sobretudo nas regiões do globo localizadas entre 30° e 45° de latitude em ambos os hemisférios (Fernández-Escobar et al., 2017). Assim, é no Mediterrâneo que o olival tem maior expressão, tendo um grande impacto na economia, história, cultura e paisagem natural desta região (Baldoni, 2009). Contudo, a sua distribuição está em expansão como resultado do aumento no consumo de azeitona e azeite em todo o mundo, o que levou recentemente ao seu cultivo noutras regiões do mundo, incluindo os continentes Americano (Argentina, Chile, Uruguai e EUA), Africano (África do Sul) e Asiático (Japão e China) (Sebastiani & Busconi, 2017). Segundo dados da FAOSTAT (2022), o continente Europeu é o maior produtor de azeitona a nível mundial (59,6%), seguido pelo Africano (23,7%), Asiático (13,2%) e Americano (3,4%), e os restantes 0,2% na Oceânia (Fig. 1).



**Figura 1.** Proporção de produção de azeitona por região no mundo (FAOSTAT, 2022).

Portugal é atualmente o sétimo maior produtor mundial de azeitona com um total de 722.580 toneladas e é o nono maior em termos de superfície com 379.44 hectares de olival, onde a maioria do território que existe é destinado para a produção de azeitona para azeite (FAOSTAT, 2020). As regiões do Alentejo, Trás-os-Montes e Beira Interior são consideradas as mais importantes a nível nacional (INE, 2020). Existem três tipos diferentes de sistema de cultivo do olival em Portugal, sendo estes determinados essencialmente pela região onde é feito o cultivo. Os sistemas existentes são: tradicional, intensivo e superintensivo. O sistema tradicional, é caracterizado por olival com densidades até 100 árvores/ha, aos quais são normalmente denominados de olivais antigos (centenários) onde se faz uso de cultivares locais. Este tipo de olival situa-se normalmente em zonas declivosas onde a possibilidade de intensificação é baixa. Quanto ao sistema de cultivo intensivo, possui até 400 árvores/ha, sendo o espaçamento determinado pela disponibilidade hídrica, cultivar e condições edafoclimáticas. Estes olivais possuem, na maioria dos casos, rega e certo grau de mecanização. Os olivais em sistema superintensivos possuem densidades de plantação de 1.200 árvores/ha, são regados, a colheita é mecanizada e têm um maior uso de fatores de produção (Fernández-Escobar et al., 2013). Sendo em 2014, 80% do olival português conduzido de forma tradicional (Reis, 2014).

## **2.2 FATORES LIMITATIVOS DA PRODUÇÃO: o exemplo da Tuberculose**

Em toda a sua área de distribuição, a oliveira é afetada por várias pragas e doenças (Abuamsha et al., 2013). As principais doenças que afetam o olival são causadas

sobretudo por fungos que afetam a parte aérea, nomeadamente o Olho de Pavão (*Spilocaea oleagina* Castagne) e a Gafa (*Colletotrichum* spp.), e a parte radicular, como a Verticilose (*Verticillium dahliae*) (Böhm, 2013). As principais doenças bacterianas incluem a Tuberculose ou ronha, e mais recentemente o declínio rápido da oliveira causada por *Xylella fastidiosa* (Castrignanò et al., 2021). O agente causal da Tuberculose é a *P. savastanoi* pv *savastanoi*, que se trata de uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Pseudomonadaceae e ao género *Pseudomonas* (Correia, 2007; Romero, 2017). Esta bactéria, inicia o processo de infeção na planta nos locais onde surgem feridas, causadas por pragas, geadas, granizo, cortes de poda ou pela colheita da azeitona, produzindo tumores (Quesada et al., 2012). Estes surgem principalmente nos ramos jovens, galhos e caules, com diferentes níveis de intensidade como observado na figura 2. Ocasionalmente também podem aparecer nas folhas e frutos, sobretudo em verões chuvosos, podendo resultar na redução da produção e qualidade da azeitona (Moretti et al., 2008; Young, 2004; Godena et al., 2012). A hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infetados da planta por esta bactéria, deve-se principalmente à produção de ácido indol-3-acético (IAA) e citocinas pela *Pss* (Surico et al., 1985; Nester & Kosuge, 1981; Comai & Kosuge, 1980). Após a invasão da bactéria no hospedeiro, inicia-se a colonização do local da infeção, seguida da desintegração e degradação de células da planta resultando na formação de uma grande cavidade em torno da área colonizada pela bactéria (Quesada et al., 2012). Estes tumores podem desenvolver-se por meses persistindo por longos períodos e, por isso, a tuberculose é considerada uma doença crónica (Buonaurio et al., 2015).



**Figura 2.** Sintomas típicos de Tuberculose da oliveira causados pela bactéria *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*) em ramos de oliveira.

O ciclo de vida deste patógeno tem sido bastante estudado nos últimos anos (Rodríguez-Moreno et al., 2009). A infecção dos tecidos internos da oliveira pela *Pss* pode ocorrer durante todo o ano, uma vez que o range de temperatura onde se dá a infecção é dos 4-38°C (Fernandez-Escobar et al., 2017). No entanto, a temperatura ideal para o desenvolvimento de *Pss* é 23-24°C, sendo, por conseguinte, o outono e a primavera os períodos ótimos de infecção (Fernandez-Escobar et al., 2017). Quando as infecções ocorrem no outono e inverno, o tumor só é visível na primavera seguinte, enquanto que as infecções de primavera e início do verão podem-se desenvolver em 10-14 dias, tornando-se especialmente mais perigosas quando se verificam valores de temperatura e humidade relativa favoráveis à bactéria, e a presença de feridas na planta (Fernandez-Escobar et al., 2017). Nos tumores formados, cerca de 50% da carga bacteriana corresponde a *Pss* e uma proporção significativa de espécies bacterianas não patogénicas (da Silva et al., 2014). Algumas destas espécies não patogénicas, nomeadamente *Erwinia toletana*, *Pantoea agglomerans* e *Erwinia oleae*, cooperam com a *Pss*, resultando num aumento da severidade da doença (Vuletin et al., 2019; Hosni et al., 2011; da Silva et al., 2014).

Uma vez no interior da planta a *Pss* pode movimentar-se através dos vasos xilémicos para outras partes da oliveira formando tumores secundários (Scortichini et al., 2004). A transmissão de *Pss* de plantas infetadas para sadias pode ocorrer a longas distâncias pela introdução e plantação de árvores infetadas. A curtas distâncias, o patógeno pode ser disseminado pela chuva, vento, ou insetos, e ainda por práticas culturais como a poda e a colheita que facilitam o processo de infecção por provocarem lesões na planta (Vuletin et al., 2019; Quesada et al., 2010). Os equipamentos utilizados na poda são um dos métodos de dispersão da *Pss* mais preocupantes pois ao entrarem em contato com a bactéria, ficam contaminados e disseminam efetivamente a bactéria para plantas não doentes (Nguyen et al., 2017; Tous et al., 2010). Atualmente, as novas plantações de olival com densidades elevadas (olivais intensivos e superintensivos) favorecem também a disseminação da bactéria devido à curta distância entre as árvores, e às feridas provocadas pela poda severa e colheita mecanizada (Quesada et al., 2012).

As perdas causadas pela tuberculose são difíceis de quantificar, dado existirem numerosos fatores que influenciam a gravidade dos sintomas. Apesar disto, é evidente os prejuízos que ocorrem tanto a nível da produção como da qualidade dos produtos do olival. A infecção por *Pss* causa uma 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., 2010). Os poucos estudos que

quantificam perdas de produção referem uma redução de 28% em árvores moderadamente infetadas (0,5-1 tumor por 30 cm de comprimento de ramo) face a árvores com níveis de infeção mais baixo (0,1-0,3 tumor por ramo) (Godena et al., 2012). Os frutos colhidos de ramos infetados com tuberculose podem originar azeites de má qualidade, com sabor a ranço e salgado, e odor desagradável (Lopes & Pinto, 2010).

### **2.3. Meios de proteção contra a tuberculose: o exemplo do controlo biológico**

Atualmente não existem métodos capazes de erradicar a doença quando detetada no olival, sendo a estratégia utilizada apenas preventiva. Desta forma, a luta cultural com recurso a práticas que minimizam a entrada da bactéria nos tecidos internos da árvore, bem como a sua dispersão no olival, tem sido a estratégia mais utilizada (Quesada et al., 2012). Por exemplo, é fundamental efetuar a remoção do material vegetal infetado através da poda e higienizar os equipamentos utilizados, bem como evitar a realização de práticas culturais que causem lesões na árvore em épocas do ano com humidade relativa elevada, por favorecer a infeção (Ramos et al., 2012; Nguyen et al., 2017). É também importante que as fertilizações e a rega sejam realizadas de um modo racional, de forma a evitar as feridas ocasionadas pela desfoliação (Quesada et al., 2012). Aquando da instalação do olival deve-se dar primazia à plantação de material vegetal acompanhado de um certificado fitossanitário, de forma a prevenir a entrada do patogénico em áreas não infetadas, e optar pelo uso de cultivares menos suscetíveis à doença. Até agora, nenhuma cultivar de oliveira foi identificada como sendo completamente resistente à tuberculose, mas diferentes cultivares exibem diferentes suscetibilidades à doença (Penyalver et al., 2006). Quando comparadas as cultivares comerciais mais importantes em Portugal, a cv. Cobrançosa é menos suscetível à doença do que a cv. Verdeal Transmontana (Gomes, et al., 2019).

A luta química tem sido usada juntamente com os métodos culturais para prevenir infeções por *Pss* (Ramos et al., 2012). A luta química baseia-se sobretudo na aplicação de fungicidas cúpricos nomeadamente hidróxido de cobre, oxiclóreto de cobre, sulfato de cobre e sulfato de cobre e cálcio (Quesada et al., 2012). O efeito dos tratamentos de cobre em *Pss* não é completamente compreendido, pensando-se que possa ter um efeito tóxico ou bacteriostático sobre o patógeno que coloniza epifiticamente a oliveira (Penyalver et al., 1998, Quesada et al., 2012). Contudo, a eficiência deste tipo de produtos é normalmente baixa e a relação custo-benefício é desfavorável para o olivicultor (Quesada et al., 2010). Por outro lado, o uso contínuo de produtos à base de cobre tem vindo a

causar efeitos adversos ao meio ambiente e adicionalmente tem-se vindo a assistir a um aumento da resistência de *Pss* a este metal (Nguyen et al., 2018b).

O impacto económico da tuberculose e a ineficácia dos meios de controlo disponíveis contra a doença, tem incentivado a procura por novos meios de luta mais eficazes e sustentáveis (Quesada et al., 2010). Neste âmbito têm sido realizados alguns estudos, sobretudo efetuados em condições controladas, com o intuito de explorar o uso de microrganismos e óleos essenciais contra a tuberculose (Mina et al., 2020b; Bouaichi et al., 2015; Filiz & Bozkurt, 2020). Entretanto existe também o uso de bacteriófagos para controlo de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em soja, não sendo encontrado ainda para o caso da tuberculose (Tarakanov et al., 2022).

No que concerne aos microrganismos, verificou-se que *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da oliveira (Rokni-Zadeh et al., 2008), *P. fluorescens* e *Bacillus subtilis* isolados de tumores e de folhas de oliveira, respetivamente (Krid et al., 2012), inibiram o crescimento de *Pss* em condições *in vitro*. Em ensaios efetuados em plântulas de oliveira em condições *in vitro*, foi verificado a capacidade de *P. fluorescens* em reduzir a população de *Pss* e o número de tumores não tendo, contudo, sido capaz de suprimir o desenvolvimento da doença (Maldonado-González et al., 2013). Recentemente, *Bacillus amyloliquefaciens* isolado de folhas de oliveira mostrou reduzir significativamente a severidade da tuberculose (até 44%), o peso dos tumores (até 55%) e a população de *Pss* nos tumores (até 27%) em plantas de oliveira inoculadas com *Pss* face às não inoculadas, em condições de estufa (Mina et al., 2020a). Tanto quanto é do nosso conhecimento ainda não foi demonstrado a eficácia de agentes de luta microbiana contra a tuberculose em condições de campo. Apesar dos resultados obtidos em condições controladas serem encorajadores é necessário a realização de mais estudos neste âmbito.

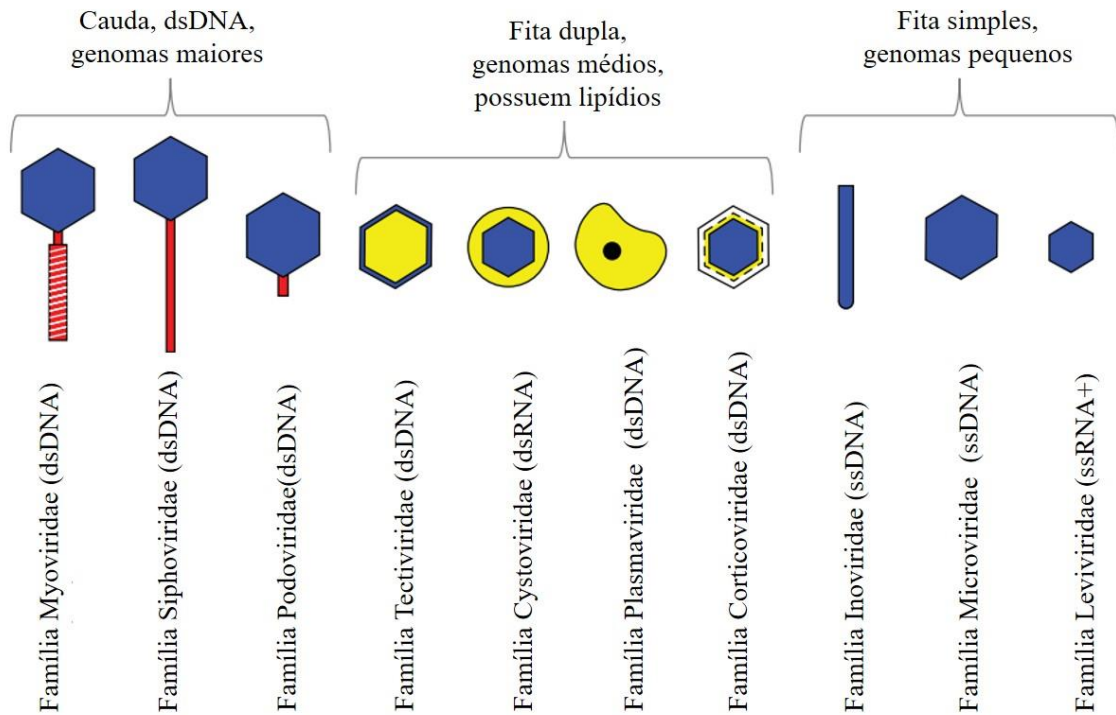
No caso dos óleos essenciais, foi utilizada uma estirpe de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* para analisar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus ciliatus*), orégão (*Origanum compactum*), alecrim (*Romasmarinus officinalis*) e absinto (*Artemisia vulgaris*), pela técnica de difusão em disco de papel. Os ensaios foram realizados *in vitro*, tendo maior inibição da *Pss*, particularmente nos óleos essenciais de tomilho e orégão necessitando maior investigação para avaliar as suas propriedades bactericidas em campo aberto (Bouaichi et al, 2015).

## 2.4 Bacteriófagos e seu potencial na proteção de plantas contra doenças

Bacteriófagos (fagos), são vírus que infetam e usam recursos bacterianos para se reproduzirem, levando posteriormente à morte da célula hospedeira (White & Orlova, 2019; Hatfull, 2011). Foram descobertos no século XX, e por muitos anos foram utilizados como agentes terapêuticos em humanos (Wittebole et al., 2014). Recentemente o seu uso no controlo de bactérias fitopatogénicas tem vindo a despertar a atenção ao nível da área da proteção de plantas (Farooq et al., 2022). Este elevado interesse pela terapia fágica deve-se ao aparecimento de bactérias fitopatogénicas resistentes ao cobre, pertencentes sobretudo aos géneros *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Behlau et al., 2012; Colombi et al., 2016; Richard et al., 2017a; Richard et al., 2017b). Sendo a aplicação de produtos cúpricos o meio de luta mais utilizado contra doenças, a sua ineficácia poderá comprometer seriamente a produção das culturas. O interesse pelos fagos deve-se também ao facto de serem extremamente eficazes e específicos na lise de bactérias patogénicas, e por não serem prejudiciais ao Homem e animais, encontrando-se na natureza de forma abundante e ubíqua (Chan, 2013). Estimativas indicam que o número total de bacteriófagos no planeta Terra possa exceder os  $10^{30}$  viriões (Whitman et al., 1998), traduzindo-se em  $10^{24}$  novas infeções fágicas a ocorrer por segundo no mundo (Hendrix, 2008).

A enorme diversidade e abundância de fagos na natureza tem levado o Comité Internacional da Taxonomia de Vírus a fazer várias revisões no sistema de classificação taxonómico. As principais propriedades analisadas nos fagos para serem classificados em grupos taxonómicos baseiam-se no tipo de ácido nucleico que possuem e o tipo de morfologia que apresentam (Fig. 3). Quanto aos ácidos nucleicos, os fagos podem possuir ADN de cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds) ou alternativamente ARN de cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds). Os fagos de ADN de cadeia dupla podem possuir cauda longa contráctil (e.g. família Myoviridae) ou não-contráctil (e.g. família Siphoviridae), cauda curta (e.g. família Podoviridae), ou sem cauda. Os fagos ADNds sem cauda possuem um genoma de tamanho inferior face aos fagos com cauda e caracterizam-se por possuírem um invólucro lipídico (e.g. famílias Tectiviridae, Plasmaviridae e Corticoviridae). Estas características são igualmente observadas nos vírus da família Cystoviridae, distinguindo-se apenas por possuírem ARNds. Os fagos de ADN e de RNA de cadeia simples são os que possuem um genoma menor e podem apresentar morfologias muito diferentes podendo ser icosaédricos (e.g. Microviridae,

Leviviridae) ou filamentosos (e.g. família Inoviridae). Cerca de 96% dos fagos conhecidos possuem cauda (Hyman e Abedon, 2012).



**Figura 3.** Morfologia e genoma (tipos de genoma e tamanho) de várias famílias de bacteriófagos. A cor azul indica capsídeos (capa proteica protetora), o vermelho indica a cauda do virião e o amarelo refere-se a lípidos. Fonte: adaptado de Hyman e Abedon (2012).

A infecção dos fagos inicia-se com o reconhecimento de recetores específicos existentes na membrana bacteriana, seguida pela adesão do vírus e sua introdução na célula hospedeira (White & Orlova, 2019). No caso de fagos com cauda, apenas o ácido nucleico e certas proteínas acessórias entram na célula hospedeira. Em fagos sem cauda, ocorre a introdução de toda a partícula fágica por processos de endocitose, translocação ou fusão do invólucro fágico. Após a entrada do ácido nucleico fágico na bactéria hospedeira inicia-se a formação de novos fagos (Fernandes, 2018; Weitz, 2013). Este processo pode ocorrer de três formas distintas, designadas por ciclos de vida lítico, lisogénico e crónica (Farooq et al., 2022). No ciclo lítico o ácido nucleico viral replica-se de forma independente do cromossoma do hospedeiro, e os novos fagos produzidos são libertados através da lise da célula hospedeira para invadirem outras bactérias. Neste ciclo, os fagos apoderam-se da maquinaria celular do hospedeiro para sintetizar as novas partículas fágicas. No ciclo lisogénico, o DNA viral é incorporado diretamente no cromossoma da bactéria (profago) ou no citoplasma sob a forma de plasmídeo, onde se replica juntamente com o hospedeiro. Neste caso, o profago/plasmídeo replica-se sem

causar a lise da célula hospedeira, sendo transmitido também às células filhas (Wittebole et al., 2014). Um bacteriófago pode classificar-se em virulento ou temperado, consoante sofra um ciclo lítico ou lisogénico, respetivamente. No ciclo de vida crónica, a taxa de infeção é reduzida devido a uma disponibilidade limitada de recetores, e o ácido nucleico fágico não é recombinado com o genoma da bactéria. Existe, todavia, produção de novas partículas fágicas, embora em menores quantidades. Não se verifica nesta alternativa a lise celular (Farooq et al., 2022). De entre estes diferentes ciclos, o lítico é o que apresenta maior interesse na terapia fágica uma vez que leva à lise da célula bacteriana (Buttimer et al., 2017). O ciclo lisogénico, também poderá ter algum interesse neste âmbito por ser possível provocar a lise bacteriana mediante estímulos específicos (Farooq et al., 2022).

O uso da terapia fágica tem, no entanto, alguns prós e contras. Como vantagens destaca-se a sua capacidade em infetar patógenos resistentes a antibióticos e a sua adaptação às espécies bacterianas (Clavijo-Coppens et al., 2021). No entanto, ainda existem alguns problemas relacionados com a seleção do fago(s) mais adequado contra uma determinada infeção, o risco de desenvolvimento de resistência a fagos, a resposta imune aos fagos por parte do hospedeiro, bem como novos requisitos regulamentares (Roach & Debarbiux, 2017; Harper, 2018).

Apesar disto existem alguns estudos que tem vindo a mostrar o enorme potencial da terapia fágica contra doenças de plantas, como por exemplo no crestamento bacteriano em alho-porro (*Pseudomonas syringae* pv. *porri*) (Rombout et al., 2016), podridão negra do brócolo (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) (Nagai et al., 2017), mancha bacteriana da pimenta (*Xanthomonas euvesicatoria*) (Gašić et al., 2018), e podridão mole da cebola (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*) (Zaczek-Moczydłowska et al., 2020). As aplicações destes fagos como agentes antimicrobianos tem revolucionado as estratégias de biocontrolo no manejo integrado das doenças sem causar danos à fauna e à flora (Farooq et al., 2022).

## **2.5. Isolamento e desenvolvimento de consórcios fágicos na proteção de plantas**

O isolamento de bacteriófagos para terapia fágica é frequentemente apresentado como um exercício bastante simples, o método básico é obter uma amostra ambiental que provavelmente contenha ou tenha estado com a bactéria hospedeira direcionada (Haines et al., 2021). Pode ser amostra de esgoto (Clavijo-Coppens et al., 2021), amostra de água (Harshitha et al., 2018), amostra de solo (Souza, 2020), etc. Sendo posteriormente a

amostra contendo fagos misturada com a bactéria hospedeira, seguido por uma simples remoção de detritos bacterianos por filtração e/ou centrifugação (Sillankorva, 2018).

Habitualmente os fagos originados demonstram especificidade do hospedeiro. Essa natureza pode limitar a aplicação de um único fago no campo para atingir diferentes patógenos de plantas na mesma localidade (Farooq et al., 2022). Portanto, um coquetel de fagos é obrigatório para o biocontrole de diversas fitobactérias resistentes em condições de campo, ao possuir um espectro mais amplo de patógenos-alvo teria um mecanismo de infecção distinto (Almeida, 2018; Bernardo et al., 2018). Na formulação de coquetéis de fagos existem várias etapas envolvidas para além do isolamento, é obrigatório avaliar o potencial terapêutico *in vivo* ou *in vitro* de um fago, incluindo a atividade de gama de hospedeiros, características genômicas, adaptações para biocontrole, requisitos de armazenamento, aplicação e eficiência contra patógenos (Casey et al., 2018).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Recolha de ramos de oliveira para isolamento de bactérias

A recolha de ramos de oliveira para o isolamento de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e de outras espécies associadas foi realizada na primavera (abril, maio e junho) de 2021, num olival localizado em Suções – Mirandela (Nordeste de Portugal), com as seguintes coordenadas 41°29'26" N; 7°15'30" O (Fig. 4). De acordo com a classificação de Köppen e Geiger, o clima da região onde se encontra este olival é do tipo Csa (Peel et. al., 2007), caracterizada por clima temperado com verões quentes e secos e invernos suaves e húmidos. O olival amostrado é composto por oliveiras centenárias, com diversas variedades antigas e desconhecidas, e conduzido em modos de produção biológica e sem rega.



**Figura 4.** Parcela de olival selecionado para amostragem de ramos de oliveira Fonte: Google Earth Pro (2015).

Neste olival foram amostradas 20 oliveiras centenárias, de diferentes variedades e selecionadas de forma aleatória. Em cada árvore, foram colhidos cinco ramos do ano aparentemente saudáveis e cinco ramos com nódulos da doença, retirou-se os ramos dos quatro quadrantes da árvore (norte/sul/leste/oeste), a uma altura de 1,60 – 1,70 metros (Fig. 5). A colheita dos ramos foi feita com uma tesoura de poda devidamente desinfetada com álcool 70% (v/v), sendo o processo de esterilização realizado a cada corte. O material vegetal recolhido foi colocado em sacos individuais estéreis com as suas respetivas identificações, sendo posteriormente armazenados em caixa térmica e encaminhados para o laboratório de AgroBioTecnologia do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e

armazenados a 4°C até ao processamento das amostras que decorrem nas 24 horas seguintes.



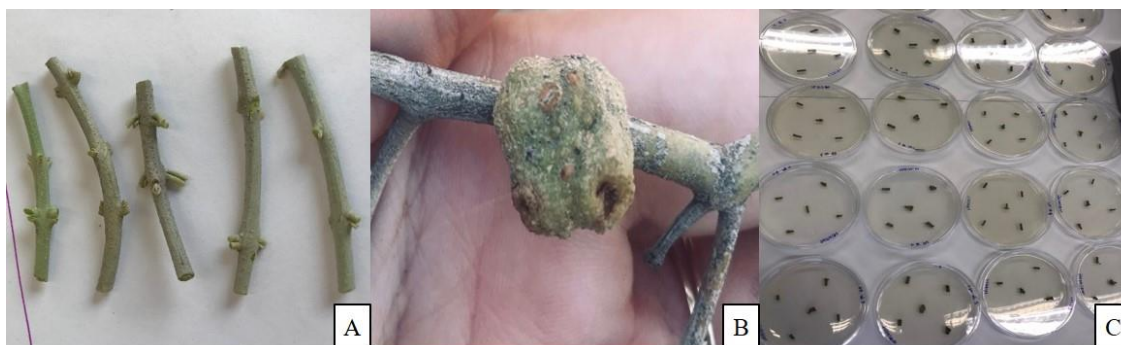
**Figura 5.** Oliveira centenária selecionada para amostragem de onde foram retiradas amostras de ramos com nódulos e sem nódulos (A); Ramo de oliveira com sintomas de doença (nódulos) (B) e ramo sem sintoma da doença (saudável) (C).

### 3.2 Isolamento Bacteriano

O isolamento de bactérias endófitas (i.e., que colonizam os tecidos internos da planta) dos ramos amostrados foi realizado utilizando 2 metodologias: i) cultura de pequenos fragmentos vegetais; e ii) cultura do macerado dos tecidos vegetais. Em ambos os casos se procedeu inicialmente à esterilização do material vegetal (i.e., caules de ramos assintomáticos e nódulos de ramos com doença) com o objetivo de eliminar a população microbiana epifítica. Este consistiu na imersão sequencial do material vegetal, com aproximadamente 4 cm de comprimento, em etanol a 70% (v/v) durante 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% (v/v) durante 1 minuto e, por último, três vezes em água destilada estéril (1 minuto em cada).

No isolamento por inoculação de fragmentos, cada caule/nódulo foi cortado em 5 segmentos (aproximadamente de 5 mm comprimento) e, em seguida, foram transferidos para uma Placa de Petri contendo meio de cultura PCA (Plate Count Agar, HIMEDIA).

O material vegetal inoculado foi colhido de 10 árvores, totalizando 500 explantes [10 árvores x 10 ramos (5 assintomáticos e 5 nódulos) x 5 explantes] (Fig. 6).



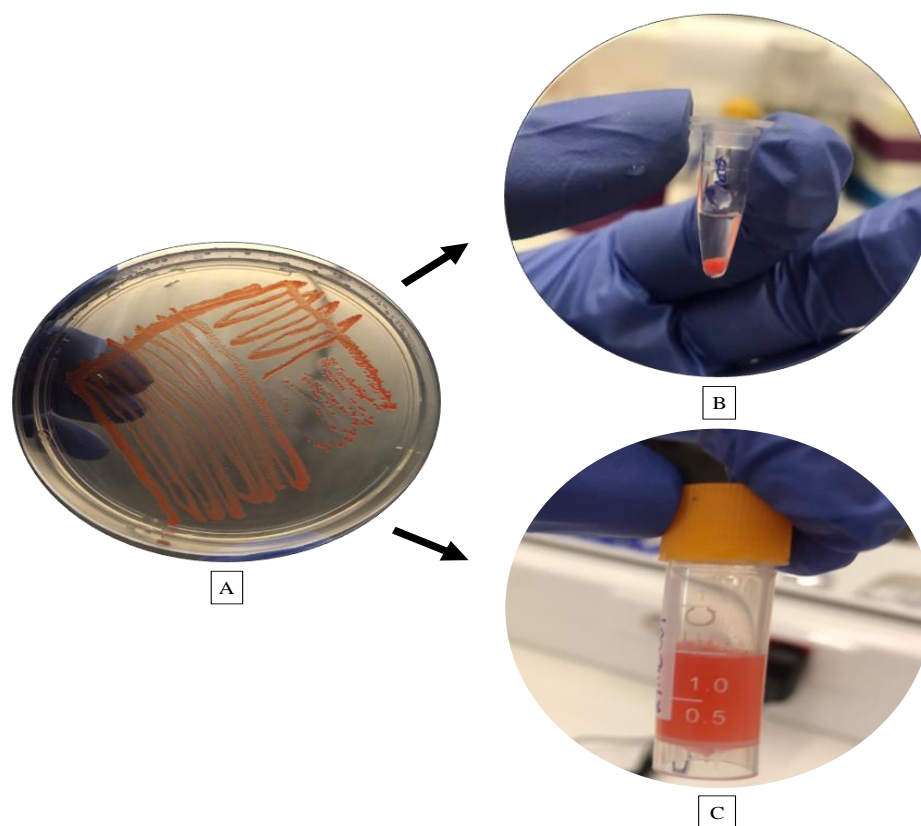
**Figura 6.** Ramos saudáveis de oliveira (A); Nódulo de tuberculose da oliveira (B); Placas de Petri com meio PCA contendo as cinco partes de ramos/nódulos distribuídas (C).

No processo de isolamento por cultura do macerado dos tecidos vegetais, foram utilizados material proveniente de outras 10 oliveiras. Após a esterilização dividiu-se os cinco ramos de cada árvore em cinco partes, obtendo vinte e cinco pedaços (1 g) que foram inseridos num almofariz e macerados com 2 ml de tampão PBS (1X) (NaCl 0,127M, KCl 0,0027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,09M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0098M, pH 7,4), em condições estéreis. Do macerado obtido foram preparadas diluições decimais seriadas (1:10), transferindo 200 µL do macerado para microtubos de 2 mL contendo 1800 µL de PBS. Cada uma das diluições preparadas (10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup>) foram inoculadas em Placas de Petri contendo meio PCA. O inóculo (100 µL) foi espalhado com recurso a um espalhador, contabilizando-se, no total, 120 Placas de Petri [10 árvores x 6 repetições (3 assintomáticos e 3 nódulos) x 2 soluções]. Depois de seladas com parafilm, as placas de Petri de ambos os métodos de isolamento foram postas a incubar à temperatura ambiente, no escuro. O crescimento bacteriano foi acompanhado diariamente, repicando para uma nova placa de Petri com meio PCA todos os isolados individualmente, de forma a obter cultura pura.

### 3.3 Identificação bacteriana

Culturas puras dos isolados bacterianos foram avaliadas pela morfologia da colónia (cor, forma, elevação e bordas), selecionando assim todos os morfotipos diferentes para a identificação molecular. Conforme mostra a figura 7, o DNA genómico de cada isolado puro foi extraído usando o kit REExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, com o auxílio de uma ponta de micropipeta

estéril foi removida uma pequena quantidade de massa microbiana de colónias em crescimento ativo para um microtubo de 200  $\mu\text{L}$  contendo 25  $\mu\text{L}$  de solução de extração, em condições estéreis na camara de fluxo laminar. Após mistura, as amostras foram incubadas a 95°C durante 10 minutos, no termociclador MyCycler da BioRad, seguida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  da solução de diluição. As diferentes amostras foram conservadas a -20 °C. Em simultâneo, com recurso a uma ansa, devidamente, esterilizada foi retirada uma quantidade significativa de massa microbiana para tubos de criopreservação de 2 mL contendo 1 mL de glicerol a 30% (v/v). Seguidamente, os distintos tubos foram criopreservados a -80 °C, de modo, a integrem a coleção microbiana do CIMO.



**Figura 7.** Extração de DNA e criopreservação de isolado bacteriano puro. Placa com bactéria pura (A); massa microbiana de colónia em microtubo com solução de extração qual posteriormente vai ao termociclador MyCycler (B); e massa microbiana em tubo de criopreservação com glicerol 30% (v/v) para armazenamento em -80°C (C)

Para a identificação molecular procedeu-se, numa primeira análise, à sequenciação da porção do gene 16S do rRNA com recurso ao par de *primers* universais 27F (Methé et al., 2012) e 534R (Muyzer et al., 1993) (Tabela 1). Para os isolados bacterianos identificados como sendo *Pseudomonas* procedeu-se, numa segunda fase, à sequenciação de uma porção do gene *iaaL*, usando os *primers* IAALF e IAALR (Penyalver et al. 2000) (Tabela 1), de forma a identificar os isolados até à espécie.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para a amplificação do DNA bacteriano.

Nome <i>primers</i>	Sequências
27F	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'
534R	5'ATTACCGCGGCTGCTGG3'
IAALF	5'GGCACCAGCGGCAACATCAA3'
IAALR	5'CGCCCTCGGAACTGCCATAC3'

As amplificações ocorreram no termociclador MyCycler™ Thermocycler (Bio-Rad), utilizando os reagentes e concentrações indicadas na Tabela 2. O ciclo de temperaturas foi de 95°C por 5 minutos para uma desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, emparelhamento a 54°C (primers 27F e 534R) e 58°C (primers IAALF e IAALR) por 50 segundos, e uma extensão a 72°C por 30 segundos. Por fim uma extensão final a 72°C por 3 minutos.

**Tabela 2.** Reagentes e respectivas concentrações utilizados para uma reação de PCR de 20 µL.

Componentes	Concentração final
ddH <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	-
Buffer (10X)	1X
dNTPS (10 mM)	0,2 mM
<i>Primer forward</i> (10 µM)	0,2 µM
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	0,2 µM
DNA Polimerase <sup>2</sup>	1,25 U
DNA	-

<sup>1</sup> água desionizada destilada autoclavada

<sup>2</sup> DFS-*Taq* DNA polymerase (Bioron, Alemanha)

Após PCR todos os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,25% em tampão TBE (1X) (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH 7,6). Foi carregado no gel, 5µL do produto da PCR com 2µL de tampão de carregamento Loading Dye Blue (6X) (Bioron, Alemanha). A separação eletroforética ocorreu a uma diferença de potencial de 100V por 30-45 minutos. Após separação, o gel foi mergulhado numa solução aquosa de GelRed™ Biotum (3X), por 20 a 40 minutos, e o DNA amplificado foi visualizado por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador ChemiDoc™ XRS+with Image Lab™ Software da BioRad (Hercules, Califórnia). Após confirmação, os produtos de PCR foram enviados para sequenciar na empresa Macrogen Spain (Madrid, Espanha).

O tratamento das sequências foi realizado com recurso ao programa bioinformático BioEdit e, em seguida, utilizou-se a base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

e o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que determina o grau de similaridade entre as sequências introduzidas e as depositadas na base de dados, através da execução de alinhamentos. Os resultados desses alinhamentos foram classificados por maior percentagem de identidade e menor valor de *E-value*.

A análise filogenética dos isolados obtidos, foi realizada recorrendo ao software MEGA X (Kumar et al., 2018). Para tal, procedeu-se numa primeira fase à pesquisa no GenBank das estirpes de referência com o melhor resultado em termos de % de similaridade dos isolados obtidos, recorrendo ao algoritmo BLAST. As árvores filogenéticas foram construídas fazendo o alinhamento múltiplo de sequências utilizando o algoritmo MUSCLE ou o algoritmo CLUSTALW (árvore que incluem apenas o género *Pseudomonas*). Todas as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método da Máxima Verosimilhança (do inglês, ML) com 1000 repetições de *bootstrap*. De acordo com o critério de informação de Akaike Corrigido, os modelos de substituição selecionados foram o GTR+G+I para a árvore filogenética com todas as bactérias sequenciadas. Para a filogenia contendo as *Pseudomonas* sequenciadas pelo gene 16S o modelo selecionado foi TN93+G+I e para as *Pseudomonas* sequenciadas com o gene IAA utilizou-se o modelo TN93+G, seguindo o mesmo critério anterior.

### **3.4 Diversidade e análise da comunidade bacteriana**

Os índices de diversidade para a comunidade bacteriana estudada foram avaliados pela determinação da riqueza (número de taxa diferentes), abundância (número de isolados por táxon) e índice de Shannon-Wiener (H). Utilizou-se o teste de comparação não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar a significância das diferenças dos valores entre os métodos de isolamento. Estes procedimentos e análises foram realizadas utilizando o software *Paleontological Statistics* v4.09 (PAST) (Hammer et al., 2001).

Para testar se existem diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os métodos de isolamentos (explante e macerado), efetuou-se uma análise multivariada utilizando-se o software *Community Analysis Package* v. 5.0 (Henderson & Seaby, 2007). Nesta análise procedeu-se à elaboração de uma ordenação não métrica multidimensional (NMDS) com 999 permutações, utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis. A análise estatística para avaliar a existência de diferenças significativas entre a estrutura das comunidades fúngicas foi realizada pela análise de similaridades - ANOSIM ( $p=0,05$ ). A medida de distância usada foi a de Bray-Curtis. Esta análise foi realizada usando o *Community Analysis Package* v. 5.0 (Henderson & Seaby, 2007).

### 3.5 Amostragem de solo para isolamento de bacteriófagos

O isolamento de bacteriófagos foi feito em amostras de solo provenientes do mesmo olival onde se isolaram as bactérias endófitas bem como de uma floresta com vegetação natural localizada próximo ao olival. A amostragem ocorreu no mês de outubro de 2021, sendo a colheita de solos feita em “zigue-zague”, a uma profundidade de 5 cm e debaixo da copa das árvores (Fig. 8). Em cada local amostrado (olival e floresta) foram colhidas três amostras de solo compostas, sendo cada uma delas constituída por três subamostras. O solo foi armazenado em sacos estéreis, devidamente identificado, e levado para o laboratório de Agrobiotecnologia do Centro de Investigação de Montanha (CIMO). Uma vez no laboratório, as amostras de solo foram submetidas a uma crivagem em crivo de malha de 2mm de diâmetro, tendo o cuidado de esterilizar o crivo entre cada amostra.



**Figura 8.** Recolha do solo realizada com o auxílio do trado.

### 3.6 Isolamento dos bacteriófagos das amostras de solo

Para o isolamento dos fagos das amostras de solo, 1 g de solo crivado foi adicionado a 10 mL de tampão de fago (100 mM Tris HCL, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,6) (Clavijo-Coppens, 2021). A mistura foi a incubar durante 2 horas sob agitação a 80 rpm, seguida por uma centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para frascos estéreis e mantido sob refrigeração a 8°C-10°C até ao isolamento e purificação dos bacteriófagos.

O isolamento de fagos das amostras foi realizado utilizando um isolado bacteriano de *P. savastanoi* pv *savastanoi* (CIMO21AC001), existente na coleção de cultura do Centro de Investigação de Montanha (CIMO-CC). Este isolado foi obtido de tumores de

oliveira e a sua identificação foi efetuada pela sequenciação de uma porção da região 16S do rDNA e do gene *iaaL* (Penyalver et al. 2000). O isolado bacteriano foi cultivado em 75 mL de meio de cultura líquido YPG (7g L<sup>-1</sup> de Peptona de carne; 7g L<sup>-1</sup> de Extrato de levedura e 7g L<sup>-1</sup> de Glucose) e incubado durante a noite a 28°C, sob agitação de 120 rpm. No processo de preparação da solução de enriquecimento, foram transferidos 400 µL desta suspensão de *P. savastanoi pv. savastanoi* em meio de cultura líquido YPG para o sobrenadante do solo obtido anteriormente. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para OD<sub>600</sub>=0,1 correspondendo a um número de células de 17,3 × 10<sup>8</sup> UFC/mL. A suspensão foi incubada durante a noite a 28°C sob agitação de 120 rpm e, em seguida, foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante da solução de enriquecimento foi transferido para um novo tubo e mantido sob refrigeração a 8°C – 10°C.

O isolamento dos bacteriófagos foi realizado, pelo método de dupla camada de meio de cultura de Adams (Souza, 2020). Para tal, uma suspensão de *P. savastanoi pv. savastanoi* foi inoculada em meio semissólido YPG (7 g/L peptona de carne; 7 g/L de extrato de levedura, 7g L<sup>-1</sup> de Glucose e 2 g/L de ágar), até atingir OD<sub>600</sub>=0,1 e mantida a 50°C. Desta solução foram retirados 3000 µL para placas de Petri que continham uma camada de meio sólido YPG (15 g/L de ágar), seguido do plaqueamento de 100 µL do sobrenadante da solução de enriquecimento. As placas de Petri foram observadas diariamente para acompanhar a formação de placas de lise avaliadas de forma visual.

### **3.7 Purificação dos bacteriófagos**

Para a purificação dos fagos, foram selecionadas as placas de lise que apresentassem características diferentes (tamanho ou formato), dando preferência às de maior tamanho. As placas de lise selecionadas, foram recortadas com um bisturi estéril e colocadas em 1000 µL de meio de cultura líquido YPG. Após agitação leve à mão, adicionou-se 100 µL de suspensão de *P. savastanoi pv. savastanoi* (OD<sub>600</sub>=0,1). As amostras foram mantidas sob agitação a 120 rpm durante a noite. Após este período ocorreu a centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos, seguido pela transferência do sobrenadante (que contém os fagos) para um novo tubo. Deste sobrenadante foram preparadas diluições decimais seriadas (1:10), transferindo 100 µL do sobrenadante para microtubos de 2 mL contendo 900 µL de meio líquido YPG. A partir da diluição 10<sup>-5</sup> procedeu-se ao isolamento de bacteriófagos pelo método de dupla camada de meio de cultura de Adams tal como descrito anteriormente (Souza, 2020). As placas de lise

formadas foram recortadas e colocadas em meio líquido YPG com a suspensão de *P. savastanoi pv. savastanoi* (OD<sub>600</sub>=0,1). Após incubação nas mesmas condições atrás referidas, procedeu-se à centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos, seguido pela transferência do sobrenadante (que contém os fagos) para um novo tubo que foi mantido a 4°C até utilização futura.

### 3.8 Efeitos dos fagos no controlo de *P. savastanoi pv. savastanoi*

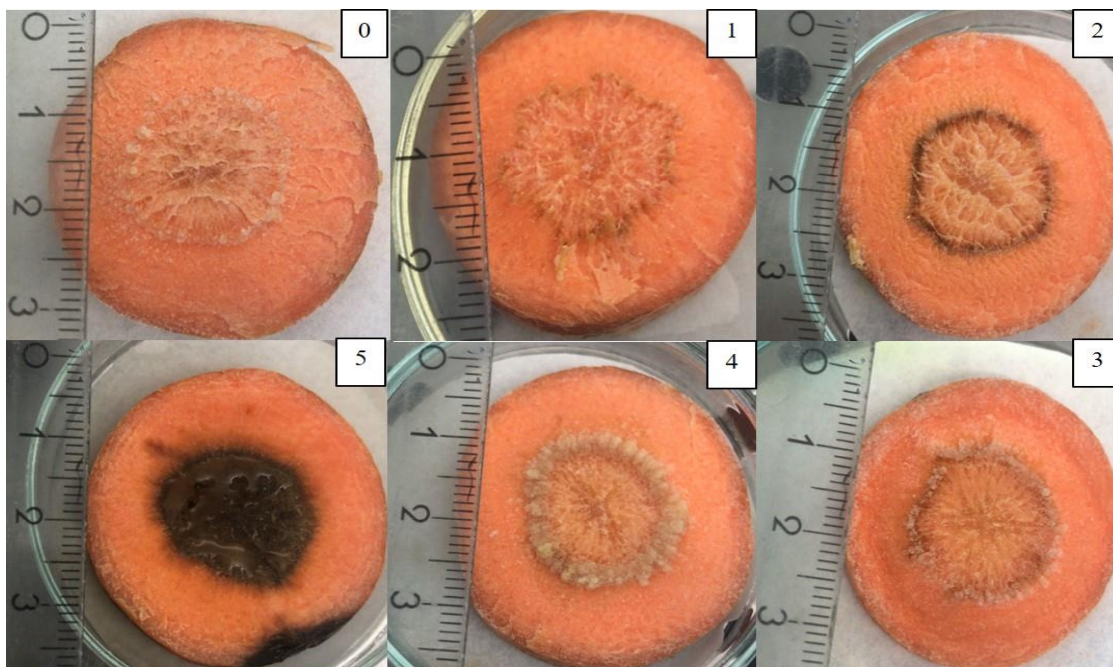
A capacidade dos fagos isolados em reduzir o desenvolvimento de tumores pela *P. savastanoi pv. savastanoi* foi avaliado em condições *in vitro* utilizando um bioensaio com cenoura, previamente validado por Doksöz & Bozkurt (2020). Para tal, cenouras biológicas, foram superficialmente esterilizadas em álcool a 70% (v/v) durante um minuto, seguida por lavagem em água destilada estéril três vezes durante um minuto cada. Após esterilização, as cenouras foram cortadas em rodela com 1-1,5 cm de espessura, e inserida uma rodela em placa de Petri contendo papel de filtro (Whatman) esterilizado. Cada uma das rodela foi inoculada no centro com 10 µL de isolado de bacteriófago (obtido em 3.6) e com 10 µL de suspensão de *P. savastanoi pv. savastanoi* (OD<sub>600</sub>=0,1). Como controlo, foram utilizadas rodela de cenoura apenas inoculadas com o patogénico (controlo positivo), ou com o bacteriófago (controlo negativo), ou sem nenhuma inoculação (controlo negativo). Prepararam-se seis repetições por tratamento. As placas de petri depois de seladas com parafilm foram postas a incubar a 27°C sem agitação, e observadas diariamente para avaliar o desenvolvimento de tumores, durante 30 dias.

Em particular foi avaliada a incidência (i.e., a percentagem de rodela de cenoura com sintomatologia) e a severidade (i.e., a área da cenoura com sintomatologia) da tuberculose. Com estes dados da escala de severidade foi determinada a curva de progresso da doença (AUDPC, do inglês *area under disease progress curve*) seguindo o procedimento descrito por Moral et al. (2008). Resumidamente, o AUDPC é uma medida quantitativa da severidade da doença ao longo do tempo, tendo-se utilizado a seguinte fórmula para estimar os seus valores:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n [(S_{i+1} + S_i)/2](t_{i+1} - t_1)$$

Onde (S) é a severidade observada no momento i, t<sub>i</sub> é o tempo (dias) da observação efetuada no momento i, e n é o número total de observações realizadas. A severidade foi estimada utilizando uma escala de 0 a 5 (Doksöz & Bozkurt, 2020), onde: 0 – ausência

de sintomas; 1- ligeiro escurecimento ao redor do centro (câmbio vascular); 2- Escurecimento destacado ao redor do centro; 3- Escurecimento ao redor do centro e ligeira formação de tumores; 4- formação de tumores mais densos e 5-Necrose central (correspondente ao xilema) (Fig. 9).



**Figura 9.** Escala descritiva para avaliar severidade da tuberculose da oliveira em fatias de cenoura: 0- sem qualquer sintoma da doença; 1- ligeiro escurecimento ao redor do centro; 2- Escurecimento destacado ao redor do centro; 3- Escurecimento ao redor do centro e ligeira formação de nó; 4- formação de nó mais denso e 5-Necrose central.

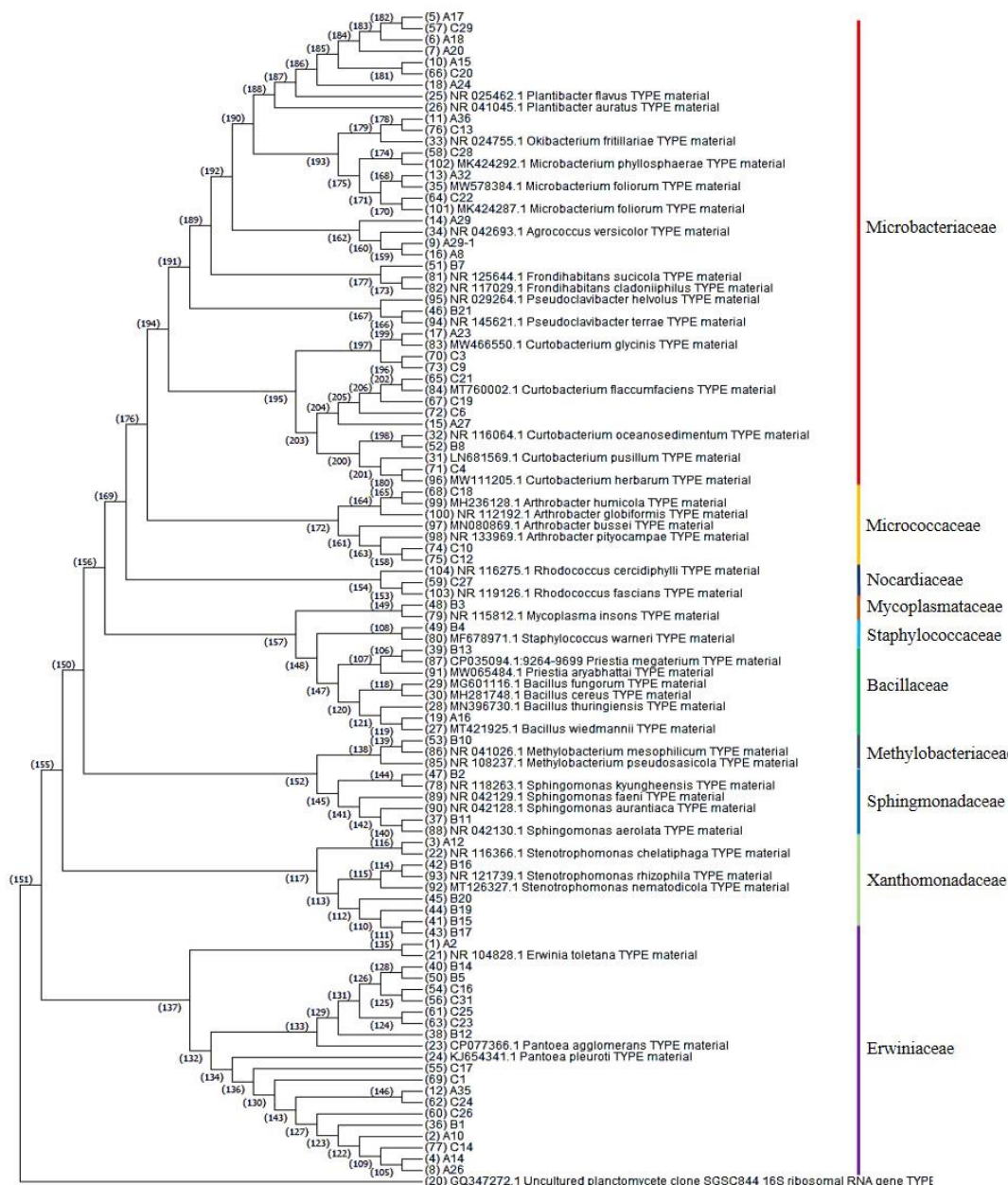
As diferenças na incidência e severidade entre tratamentos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), calculadas pelo teste de Kruskal-Wallis, para probabilidades  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  considerando-se, respetivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas. Estes procedimentos e análises foram realizadas utilizando o software *Paleontological Statistics* v4.09 (Hammer et al., 2001).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Comunidade bacteriana endófito

O isolamento de bactérias dos nódulos e ramos de oliveira sem sintomas, pelos dois métodos (i.e., explante e macerado), permitiu obter um total de 69 unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *operational taxonomic units*) (Tabela S1 e S2, ANEXO). Para corroborar a identificação dos isolados bacterianos a partir do BLAST, procedeu-se à sua análise filogenética onde foram incluídas sequências de referência do gene 16S do rRNA, obtidas no Genbank. Esta análise foi efetuada para todos os isolados, sem incluir *Pseudomonas*. Este género foi analisado separadamente, fazendo duas análises filogenéticas baseadas nas sequências dos genes 16S de rRNA e gene *iaaL* com o objetivo de tentar identificá-los até à espécie.

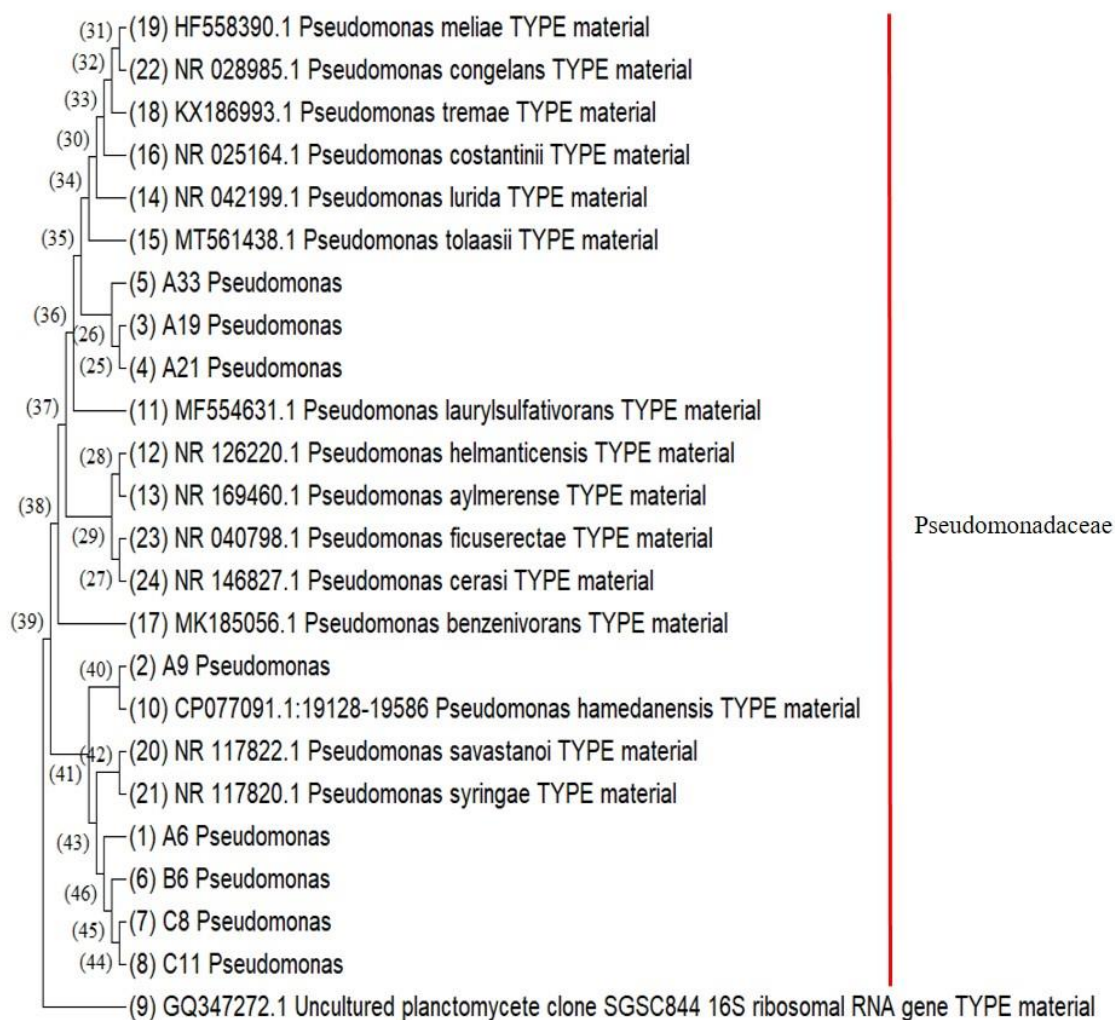
A primeira árvore (sem o género das *Pseudomonas*) distribui 61 OTUs em dez famílias e 18 géneros distintos (Fig. 10). Os isolados identificados até ao género através do BLAST, agruparam no mesmo ramo específico de cada género o que suporta a sua identificação. Nesta análise verifica-se que a maioria dos OTUs (26 no total) pertence à família Microbacteriaceae e géneros *Agrococcus*, *Fronidhabitans*, *Plantibacter*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Pseudoclavibacter* e *Okibacterium*, seguindo-se a família Erwiniaceae com 18 OTUs pertencentes aos géneros *Pantoea* e *Erwinia*, e finalmente a família Xanthomonadaceae com 6 OTUs pertencentes ao género *Stenotrophomonas*. As famílias menos representadas foram Micrococcaceae (com 3 OTUs do género *Arthrobacter*), Bacillaceae (com 2 OTUs dos géneros *Priestia* e *Bacillus*), Sphingomonadaceae (com 2 OTUs do género *Sphingomonas*), Staphylococcaceae (com 1 OTU do género *Staphylococcus*), Mycoplasmataceae (com 1 OTU do género *Mycoplasma*), Methylobacteriaceae (com 1 OTU do género *Methylobacterium*) e Nocardíaceae (com 1 OTUs do género *Rhodococcus*).



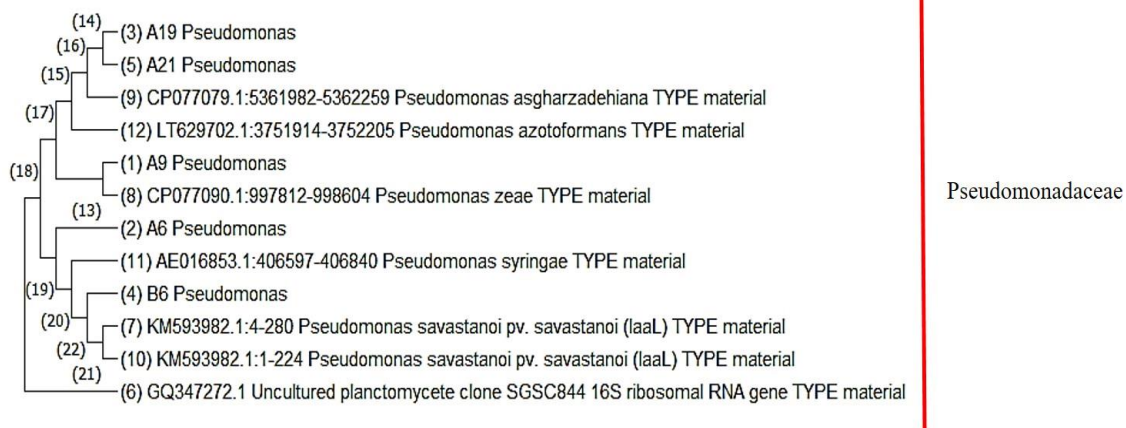
**Figura 10.** Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro General Time Reversible (G+I) e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências do gene 16S rRNA, dos isolados de ramos saudáveis e de nódulos com sintomas da doença tuberculose da oliveira.

Na árvore filogenética das *Pseudomonas*, foram avaliadas oito OTUs identificadas como *Pseudomonas* aquando da realização do BLAST. A árvore obtida com base na análise das sequências do gene 16S do rRNA, permitiu agrupar estes oito OTUs em três clados (Fig. 11). O clado composto pelos OTUs A33, A19 e A21 encontra-se filogeneticamente relacionado com muitas espécies distintas, não permitindo, por isso, efetuar uma identificação destes três isolados até à espécie. Por sua vez, o OTU A9 forma um clado com a espécie *Pseudomonas hamedanensis*, sugerindo tratar-se da mesma

espécie; enquanto que os OTUs A6, B6, C8 e C11, formam um terceiro clado filogeneticamente relacionado com as espécies *Pseudomonas savastanoi* e *Pseudomonas syringae*. A árvore filogenética obtida através da análise da sequência génica *iaaL* origina resultados ligeiramente diferentes, na qual foram avaliadas cinco OTUs identificadas como *Pseudomonas* (Fig. 12). Esta árvore também agrupa no mesmo clado os OTUs A19 e A21, mas filogeneticamente próximos de *Pseudomonas asgharzadehiana*. O OTU A9 também aqui forma um clado sozinho, mas com a espécie *Pseudomonas zeae*. Por sua vez, os OTUs A6 e B6 formam um clado, mas A6 relaciona-se filogeneticamente com *Pseudomonas syringae*, enquanto que B6 se relaciona filogeneticamente mais com *Pseudomonas savastanoi*.



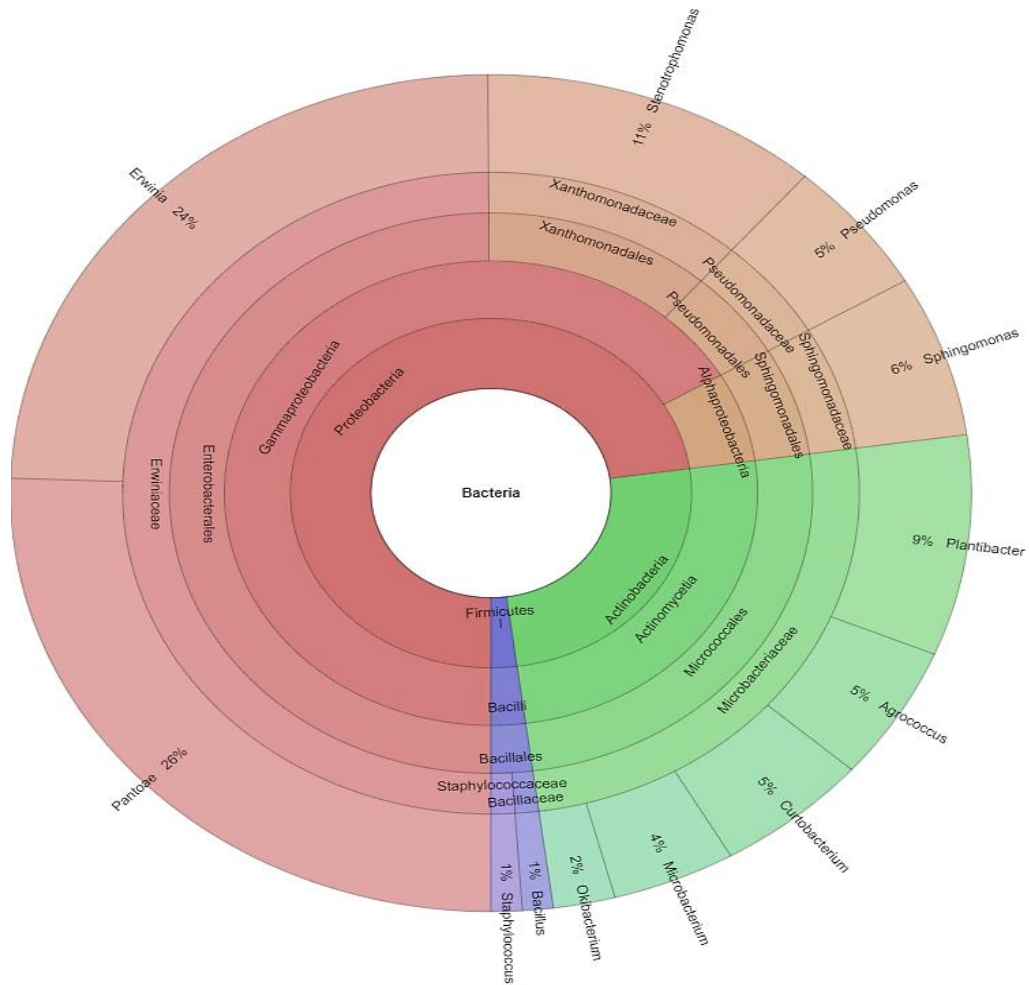
**Figura 11.** Árvore filogenética do género *Pseudomonas* com sequências obtidas da região 16S do rRNA, determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Tamura Nei (G+I) e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências dos isolados de ramos saudáveis e de nódulos da oliveira.



**Figura 12.** Árvore filogenética do género *Pseudomonas* com sequências obtidas do gene *iaaL*, determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Tamura Nei (G) e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências dos isolados de ramos saudáveis e de nódulos da oliveira.

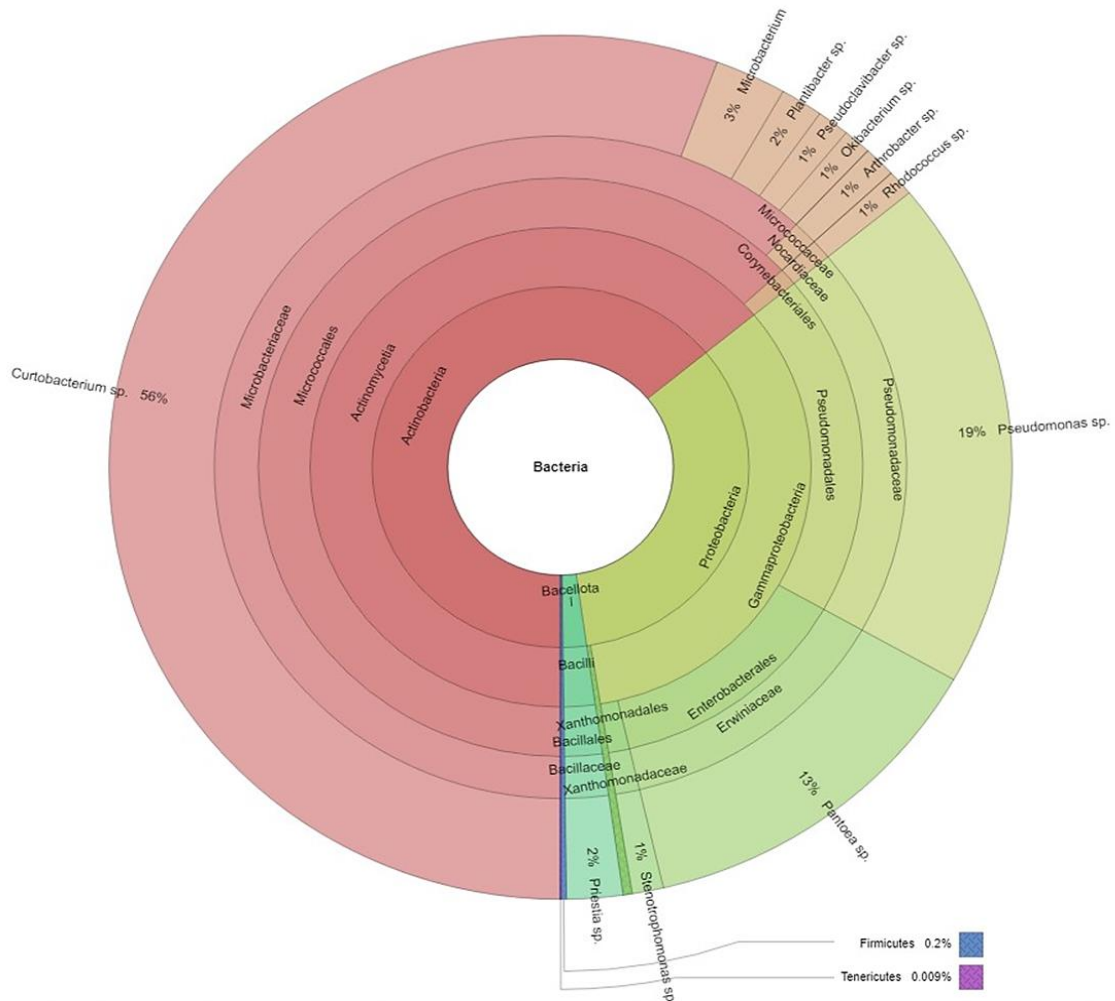
#### 4.2 Comparação entre técnicas de isolamento e material vegetal na diversidade bacteriana

Neste trabalho testaram-se duas técnicas para isolar as bactérias endofíticas presentes em nódulos e ramos sem doença. Apesar de não se poder comparar estas duas técnicas por terem sido testadas em árvores diferentes, verificou-se que o método por explante permitiu obter uma menor diversidade taxonómica (no total 24 OTUs pertencentes a 3 filos, 4 classes, 6 ordens, 7 famílias e 12 géneros) face ao método de maceração (no total 45 OTUs pertencentes 5 filos, 5 classes, 9 ordens, 11 famílias e 16 géneros). De igual modo foram observadas diferenças entre estas técnicas ao nível da composição da comunidade bacteriana obtida. Na técnica de isolamento por explante observou-se uma maior predominância de isolados pertencentes ao filo Proteobacteria (73% do total dos isolados), classe Gammaproteobacteria (67%), ordem Enterobacterales (50%), família Erwiniaceae (50%), e géneros *Pantoea* (26%) e *Erwinia* (24%) (Fig. 13).



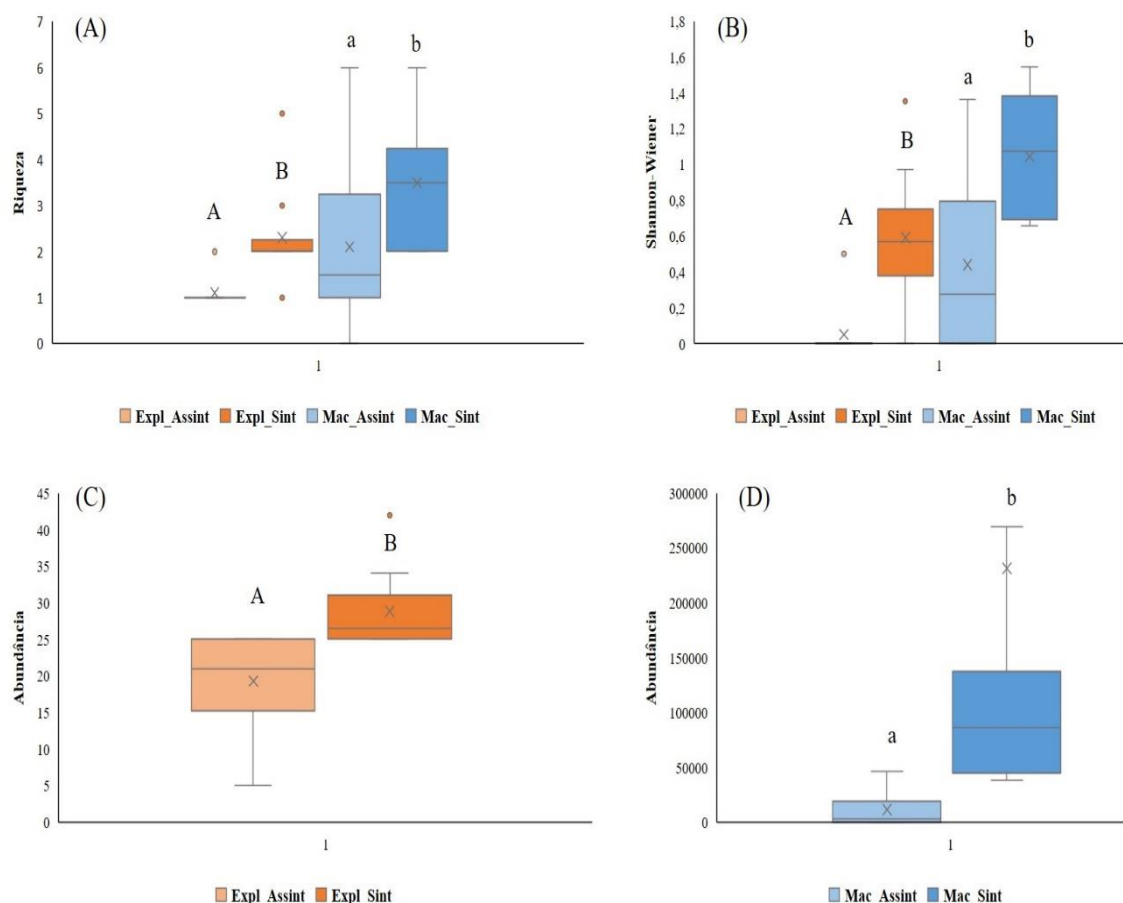
**Figura 13.** Gráfico Krona representando a abundância em cada nível taxonômico, desde o filo até ao gênero, das comunidades bacterianas obtidas pelo método de isolamento por explante.

Por sua vez, a maioria dos isolados obtidos pela técnica por maceração pertenciam ao filo Actinobacteria (64% do total dos isolados), classe Actinomycetia (64%), ordem Micrococcales (63%), família Microbacteriaceae e gênero *Curtobacterium* (56%) (Fig. 14).



**Figura 14.** Gráfico Krona representando a abundância em cada nível taxonômico, desde o filo até ao género, das comunidades bacterianas obtidas pelo método de isolamento por maceração.

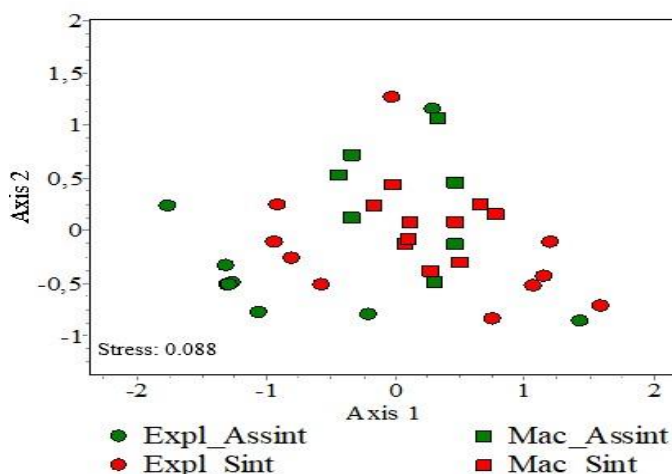
A comunidade bacteriana associada aos dois tipos de material vegetal estudados (*i.e.*, caules assintomáticos e nódulos) foi comparada em termos diversidade (riqueza e Shannon – Wiener) e abundância (Nº total de isolados) (Fig. 15). Esta comparação foi feita para cada uma das técnicas de isolamento efetuadas. Os resultados mostram que quer a diversidade, expressa em riqueza e índice de Shannon - Wiener, bem como a abundância de espécies bacterianas foi significativamente ( $p < 0,05$ ) superior nos nódulos face aos caules sem sintomas, em qualquer das técnicas de isolamento utilizadas. Através da técnica de explante, os nódulos mostraram ter maior diversidade (11 vezes mais) e abundância (1,5 vezes mais) bacteriana face aos caules sem sintomas. De igual modo, na técnica de maceração obteve-se uma maior diversidade (2,3 vezes) e abundância (20 vezes) bacteriana nos nódulos face aos caules sem sintomas.



**Figura 15.** Gráficos Boxplot com os valores de diversidade (A e B) e abundância (C e D) da comunidade bacteriana associada aos nódulos (Sint) e caules sem sintomas (Assint) obtida pela técnica de isolamento por explante (Expl) e macerado (Mac). A linha horizontal representa a mediana, a caixa o intervalo interquartil e as linhas verticais os valores extremos, respectivamente. As barras com letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre nódulos e caules sem sintomas na técnica de explante (letras maiúsculas) ou do macerado (letras minúsculas).

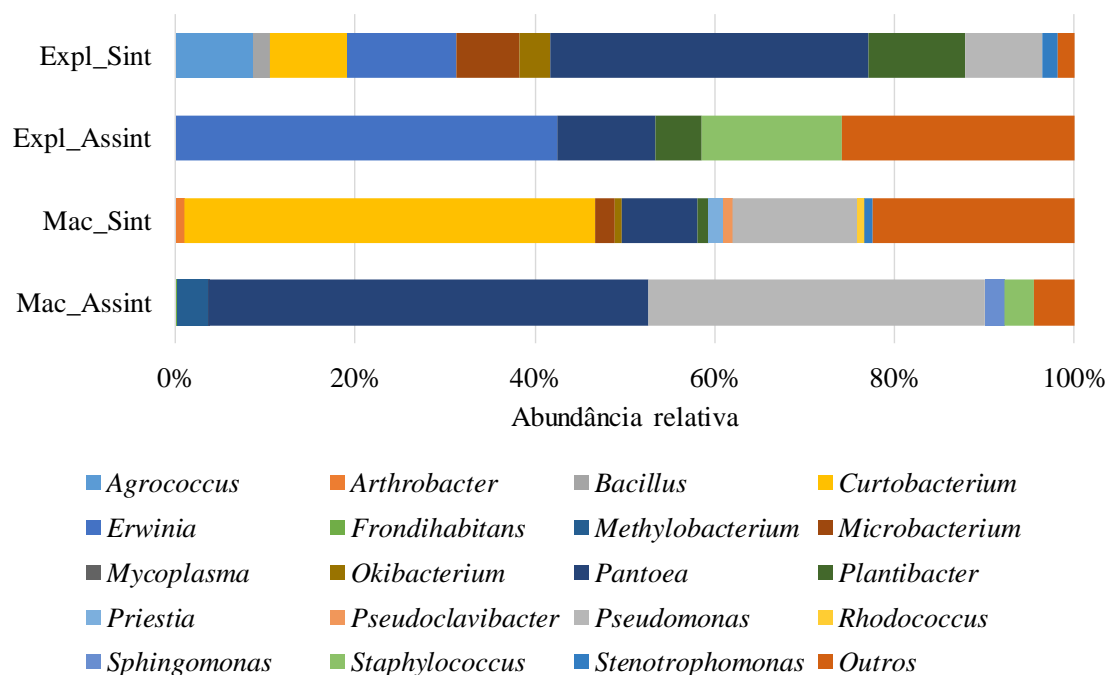
A similaridade na composição da comunidade bacteriana entre nódulos e caules sem sintomas foi avaliada através da ordenação não métrica multidimensional (NMDS) (Fig. 16) e ANOSIM (Tabela S3, ANEXO), para cada uma das técnicas de isolamento o ANOSIM, gera um *valor-p*, que avalia o nível de significância ( $p < 0,05$ ), e um valor-R que varia entre 0 (indistinguível) e 1 (completamente dissimilar), que determina o nível de similaridade/dissimilaridade na composição bacteriana. O valor de stresse de Kruskal foi usado no NMDS para estimar a qualidade de ajuste do modelo, comumente aceitável quando o valor é menor que 0,2 (McCune et al., 2002). Os resultados obtidos, mostram que no geral existem diferenças significativas ( $p = 0,011$ ) ao nível da composição bacteriana entre nódulos e caules sem sintomas, apesar de serem muito reduzidas ( $R_{ANOSIM} = 0,099$ ) (Tabela S3, ANEXO). Estas diferenças foram sobretudo notórias

quando o isolamento bacteriano foi efetuado pela técnica de maceração ( $R_{ANOSIM}=0,227$ ,  $p=0,005$ ), não se registrando diferenças significativas na composição bacteriana entre nódulos e caules sem sintomas pela técnica de explante ( $R_{ANOSIM}=0,066$ ;  $p=0,110$ ). Este resultado é corroborado pelo gráfico NMDS (Fig. 16) onde é possível observar que não existe uma clara separação das comunidades bacterianas entre os nódulos (indicado pelos símbolos a vermelho) e os caules sem sintomas (indicados pelos símbolos a verde) no total da amostragem, mas na comunidade bacteriana obtida pela técnica de maceração já é possível observar uma ligeira separação. A análise SIMPER mostra que os géneros que mais contribuíram para a diferenciação da comunidade bacteriana entre nódulos e caule sem sintomas pelo método da maceração foram *Pantoea* (24,1%), *Pseudomonas* (23,5%) e *Curtobacterium* (17,3%). Estes três géneros surgiram em maior abundância 3, 7 e 12377 vezes nos nódulos face aos caules sem sintomas respetivamente.



**Figura 16.** Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) da comunidade bacteriana associada aos nódulos (Sint) e caules sem sintomas (Assint) obtida pela técnica de isolamento por explante (Expl) e macerado (Mac). Esta análise foi efetuada usando o coeficiente de Bray-Curtis. Os valores de Krustal stresse inferiores a 0,2 correspondem a uma boa ordenação, a duas dimensões.

A análise da composição da comunidade bacteriana no material vegetal amostrado mostra uma predominância nos nódulos de espécies pertencentes aos géneros *Pantoea* (35% do total dos isolados) pelo método de isolamento por explante e *Curtobacterium* (46% do total dos isolados) pela técnica de maceração (Fig. 17). Por sua vez, nos caules sem sintomas observou-se uma predominância de bactérias do género *Erwinia* (42% do total dos isolados) pelo método de isolamento por explante e, dos géneros *Pantoea* (49%) e *Pseudomonas* (37%) pelo método de maceração.

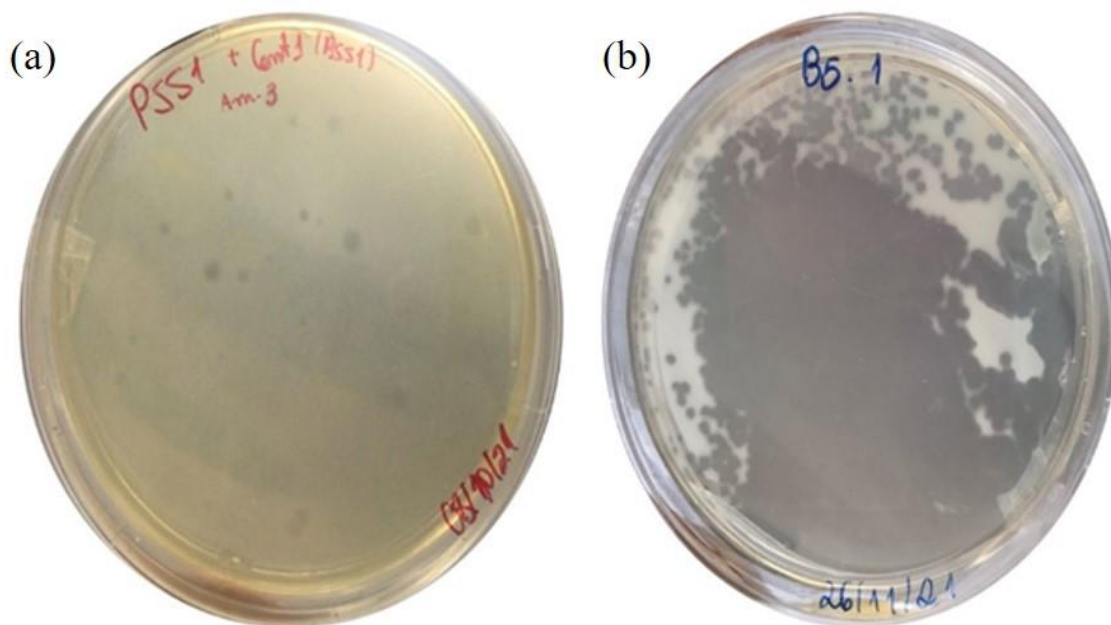


**Figura 17.** Abundância relativa (%) dos géneros de bactérias presentes nos nódulos (Sint) e caules sem sintomas (Assint) obtida pela técnica de isolamento por explante (Expl) e macerado (Mac), bem como o total (Total).

### 4.3 Isolamento de bacteriófagos

O isolamento de bacteriófagos foi efetuado em amostras de solo proveniente do mesmo olival onde se estudou a comunidade bacteriana endofítica de nódulos e caules sem sintomas, bem como de uma floresta localizada na proximidade do olival. Para o isolamento, optou-se por usar como hospedeiro um isolado de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (CIMO21AC001) pertencente à coleção da cultura do CIMO, uma vez que não foi possível identificar até à espécie nenhuma das oito *Pseudomonas* obtidas no presente estudo. Das 6 amostras de solo analisadas (3 do olival e 3 da floresta), apenas 2 amostras do olival apresentaram bacteriófagos com atividade lítica sobre *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. A presença de bacteriófagos nestas amostras foi detetada pela formação de placas de lise, tal como representado na figura 18a. As placas de lise que apresentavam características diferentes (tamanho ou forma) e com maior tamanho, foram selecionadas para a obtenção de bacteriófagos puros. No total foram selecionadas 9 placas de lise, cada uma delas correspondendo potencialmente a um bacteriófago. Para obter culturas puras de cada um destes bacteriófagos, procedeu-se à sua diluição seriada cinco vezes ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ...). Utilizando apenas a quinta diluição que formou placas de lise de maior tamanho (ou seja, com maior atividade lítica) procedeu-se à purificação para avaliar o seu efeito no

controle de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* em bioensaios. Na figura 18b é mostrado o bacteriófago que foi selecionado B5, tendo formado uma placa de lise do tamanho da placa de Petri (9 cm de diâmetro) em culturas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

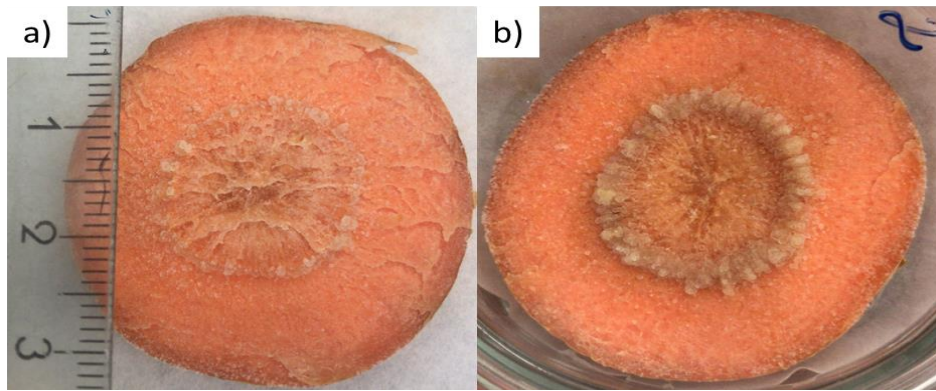


**Figura 18.** Placas de lise em culturas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* mostrando a presença de vários bacteriófagos isolados do solo do olival (a) e, de uma cultura pura de bacteriófago da diluição  $10^{-5}$  (b).

#### 4.4 Eficiência do bacteriófago no controle de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

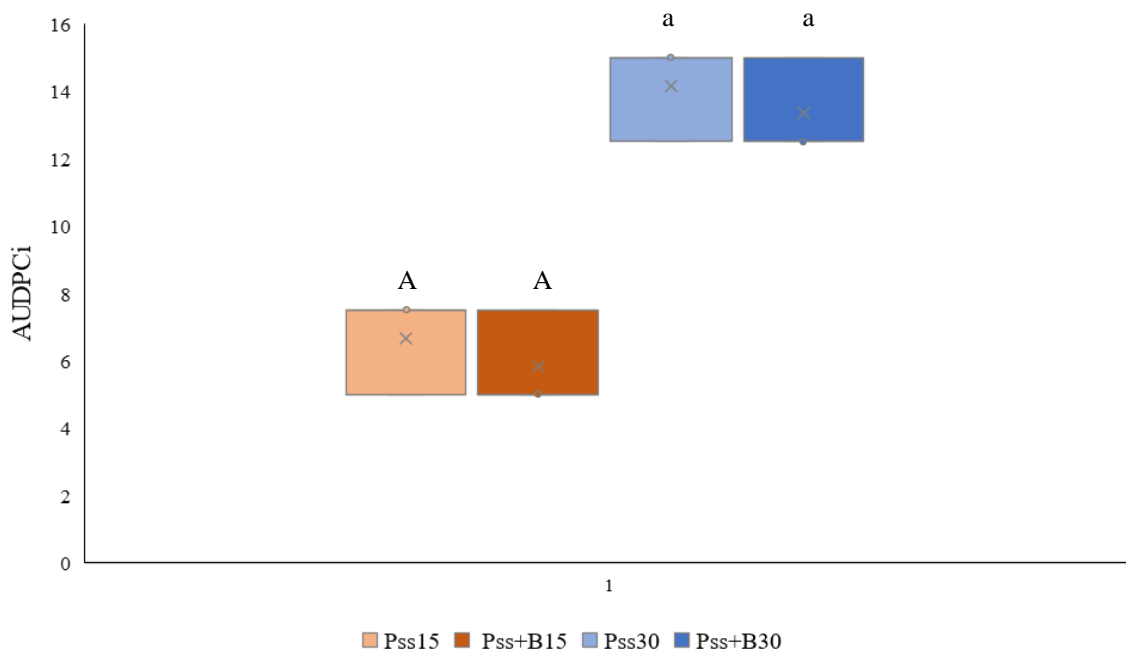
Para avaliar a eficiência do bacteriófago selecionado no controle de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, utilizou-se um bioensaio com cenouras previamente otimizado por Doksöz & Bozkurt (2020). Para tal foi estimada a incidência e a severidade do desenvolvimento de tumores em rodela de cenoura inoculadas apenas com *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*), com o bacteriófago ou com *Pss* + bacteriófago.

Pelos dados obtidos, verificou-se que os fagos adquiridos neste trabalho não apresentaram quaisquer diferenças quando inoculados em cenoura com *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, tendo sido monitorados por 30 dias após inoculação. As primeiras diferenças visíveis, apareceram uma semana após a inoculação onde as formações mais expressivas de nós ocorreram nos primeiros 15 dias e permaneceram estáveis até o 30º dia. Como o controle sem a inoculação de *Pss* não desenvolveu sintomatologia típica de tuberculose durante a realização do ensaio, foi possível confirmar a patogenicidade da bactéria quando comparada com as fatias de cenoura inoculadas com patógeno (Fig. 19).



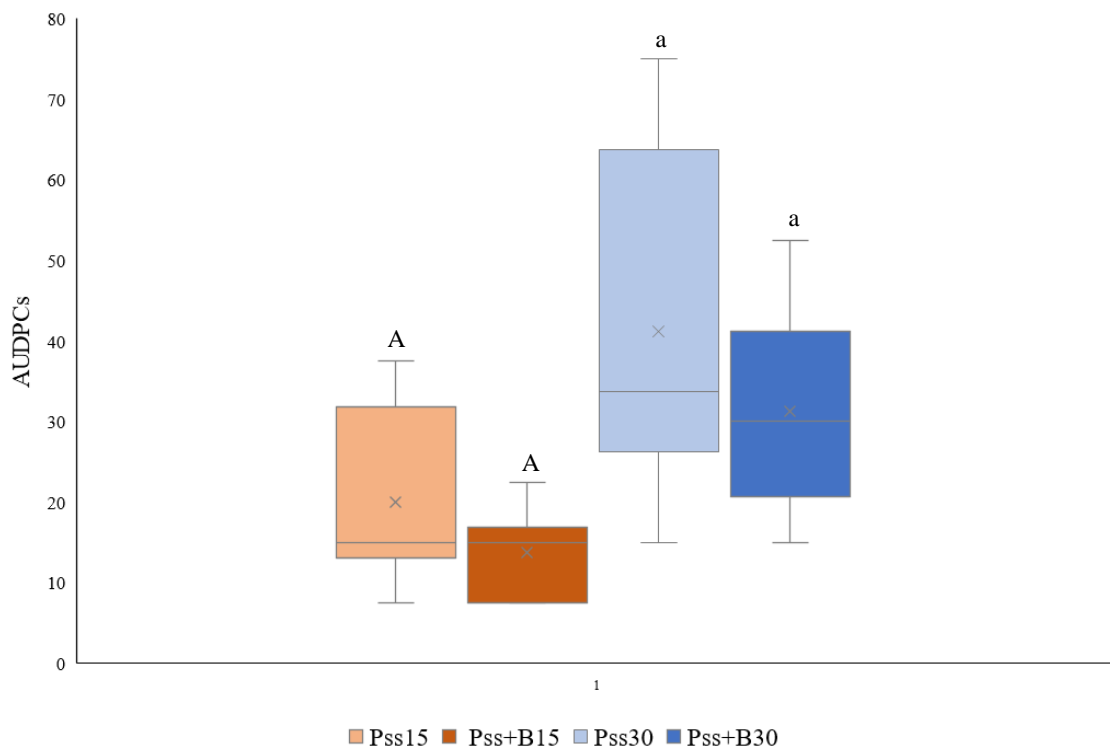
**Figura 19.** Comparação entre fatias de cenoura após 15 dias. Controle sem inoculação de *Pss* (a); inoculação somente com bactéria *Pss* (b).

A incidência da doença obtidos da AUDPCi entre cenouras inoculadas somente com *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e com *Pss* em conjunto com o bacteriófago não mostraram diferenças significativas (Fig. 20). Sendo o valor-*P* da comparação entre amostras aos 15 dias (*Pss*15 vs *Pss*+B15)  $p = 0,518$  e aos 30 dias (*Pss*30 vs *Pss*+B30)  $p = 0,518$ .



**Figura 20.** Gráficos Boxplot de análise dos diferentes tratamentos usando os dados da incidência (AUDPCi), das amostras *Pss* (Inoculação somente com *P. savastanoi* pv. *savastanoi*) e *Pss*+B (Inoculação com *P. savastanoi* pv. *savastanoi* mais bacteriófago) no dia 15 e no dia 30. As letras são usadas para indicar as diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ), entre *Pss*15 e *Pss*+B15 (Dia 15 - letras maiúsculas) ou *Pss*30 e *Pss*+B30 (Dia 30 -letras minúsculas).

Do que concerne à severidade, os resultados obtidos da AUDPCs em cenouras inoculadas somente com *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e com *Pss* em conjunto com o bacteriófago não mostraram diferenças significativas (Fig. 21). O valor-*P* adquirido na comparação das amostras aos 15 dias (*Pss*15 vs *Pss*+B15) foi de  $p = 0,253$  e aos 30 dias de (*Pss*30 vs *Pss*+B30)  $p = 0,361$ .



**Figura 21.** Gráficos Boxplot de análise dos diferentes tratamentos usando os dados da severidade (AUDPCs), das amostras *Pss* (Inoculação somente com *P. savastanoi* pv. *savastanoi*) e *Pss*+B (Inoculação com *P. savastanoi* pv. *savastanoi* mais bacteriófago) no dia 15 e no dia 30. As letras são usadas para indicar as diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ), entre *Pss*15 e *Pss*+B15 (Dia 15 - letras maiúsculas) ou *Pss*30 e *Pss*+B30 (Dia 30 - letras minúsculas).

## 5. DISCUSSÕES

### 5.1 Comunidade bacteriana endófitas

No presente trabalho foi avaliado, numa primeira fase, a comunidade bacteriana endofítica presente em nódulos e caules sem sintomas de oliveiras centenárias. Este estudo foi feito recorrendo a métodos dependentes de cultura com o intuito de obter uma coleção de microrganismos. Em particular, pretendia-se obter diferentes isolados de *P. savastanoi pv. savastanoi* para serem usados no isolamento de bacteriófagos (ou fagos), que constitui a segunda parte do presente estudo. Dada a especificidade dos fagos para uma dada estirpe (Fernández et al., 2019), é recomendável que durante o processo de pesquisa de fagos seja incluído o maior número possível de isolados da espécie hospedeira. Dos 69 OTUs isolados, foram distinguidos oito pertencentes ao género *Pseudomonas*. No entanto, a caracterização molecular (16S rRNA e *iaaL*) destas 8 OTUs não permitiu a sua identificação a níveis taxonómicos mais baixos, sendo necessário efetuar no futuro estudos filogenéticos que incluam mais marcadores moleculares (e.g. *gyrB* e 16S-23S rRNA (ITS)). Este estudo deverá ser realizado em particular para os OTUs A6, B6, C8 e C11, que mostraram estar relacionadas com *Pseudomonas savastanoi* e *Pseudomonas syringae*, que constituem duas espécies filogeneticamente próximas e difíceis de distinguir (Gomila et al., 2017). A coleção de bactérias endofíticas obtida neste estudo poderá ainda ser bastante útil em trabalhos futuros que pretendam explorar estes isolados na luta biológica contra a tuberculose da oliveira.

A abordagem de métodos culturais usada para o estudo da diversidade endofítica apresenta, no entanto, o inconveniente de não permitir uma caracterização completa da comunidade bacteriana, uma vez que alguns microrganismos podem ser incapazes de crescer em meios de cultura artificiais (Bonnet et al., 2020). Apesar desta limitação verificou-se que a maioria dos isolados bacterianos obtidos no nosso estudo pertenciam aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, à semelhança do reportado anteriormente em trabalhos similares efetuados na oliveira usando métodos dependentes (Mina et al., 2020b) ou independentes (Müller et al., 2015) de cultivo. Curiosamente muitas espécies pertencentes ao filo Proteobacteria e Firmicutes são caracterizadas como tendo um papel promotor no crescimento das plantas (Elmagzob et al, 2019) e algumas demonstraram ainda ter um enorme potencial no controlo biológico de doenças, incluindo da oliveira (Bizos et al., 2020). Neste âmbito, destacam-se as espécies do género

*Pseudomonas* (filo Proteobacteria) e *Bacillus* (filo Firmicutes). Vários isolados de *Pseudomonas* (Schilirò et al., 2012; Gomez-Lama et al., 2018a; Sanei & Razavi, 2011; Prieto et al., 2011; Cabanás et al., 2017) e de *Bacillus* (Gomez-Lama et al., 2018b), mostraram ser efetivos contra a verticilose em plântulas de oliveira em condições de estufa. De igual modo, as espécies *Bacillus mojavensis* (Ghanney et al., 2016), *B. subtilis* (Bouaichi et al., 2019) e *P. fluorescens* (Maldonado-González et al., 2013) mostraram capacidade de reduzir o desenvolvimento de tumores na oliveira, causados pela *P. savastanoi pv. savastanoi*, bem como reduzir o peso dos tumores e a abundância da população patogénica. Face ao exposto, trabalhos futuros devem avaliar o potencial dos isolados obtidos no presente estudo no controlo da tuberculose da oliveira. Segundo Ting (2014), plantas resistentes ou assintomáticas em áreas infetadas são mais propensas a apresentar endófitos com potencial de controlo biológico do que outras plantas. Assim, é esperado que os isolados bacterianos obtidos dos caules sem sintomas sejam mais promissores para o controlo biológico da tuberculose.

Esta hipótese é reforçada pelo resultado da comparação da comunidade bacteriana entre nódulos e caule sem sintomas que mostrou ser distinto ao nível da diversidade e composição. Não só a diversidade, mas também a abundância de endófitos bacterianos aumentou significativamente na presença de *P. savastanoi pv. savastanoi*, tal como reportado anteriormente por Mina et al. (2020b). Este resultado sugere que a presença de *P. savastanoi pv. savastanoi* tem influência no estabelecimento da comunidade bacteriana nos nódulos. Este efeito pode ter resultado de alterações no metabolismo da planta induzidas pelo patogénico que vai favorecer a colonização de espécies endofíticas específicas. Adicionalmente, o patogénico pode ter a capacidade de alterar o habitat por ele colonizado, de modo a favorecer o seu crescimento bem como o de outras espécies que com ele cooperam e a dificultar a colonização de espécies antagonistas. Este efeito de favorecimento de certas espécies microbianas em detrimento de outras foi anteriormente exibido por algumas bactérias na rizosfera (Scharf et al., 2016). Assim, as mudanças na composição da comunidade bacteriana podem ser o resultado dos comportamentos de cooperação e competição de *P. savastanoi pv. savastanoi* com outros microrganismos, tal como reportado anteriormente (Dandekar et al., 2013; Tashiro et al., 2013).

Curiosamente, observou-se diferenças na composição bacteriana entre nódulos e caules sem sintomas, ocorrendo uma predominância dos géneros *Pantoea* e *Curtobacterium* nos nódulos. Este resultado sugere que membros destes dois géneros

possam cooperar com *P. savastanoi pv. savastanoi* no desenvolvimento da doença na oliveira. Estudos prévios tinham similarmente reportado a existência de associação de *Pantoea agglomerans* com *P. savastanoi pv. savastanoi* em nódulos, a sua frequente presença e isolamento no mesmo ambiente, sugere que podem ocorrer interações, formação de comunidades e sinergismos. A comunidade bacteriana do nó da oliveira, portanto, fornece um nicho especial para estudar o papel da comunicação entre espécies e a interação da comunidade entre o patógeno e as bactérias residentes no desenvolvimento da doença. (Hosni et al., 2011). Os nós causados pela *Pss* associam-se com bactérias do género *Curtobacterium*, algumas espécies endófitas desse género estão ligadas à indução de resistência sistémica quando interagem com outras bactérias promotoras de crescimento e manutenção da doença contribuindo com o patógeno (Buonaurio et al., 2015; Xu et al., 2019).

Nos caules sem sintomas observou-se uma predominância de bactérias do género *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. Espécies dos géneros *Pantoea* e *Erwinia*, são bactérias não patogénicas que estão constantemente associadas a *Pss*, na medida que aumentam a gravidade da doença. Estudos realizando co-inoculação de *Erwinia toletana* com *Pss*, aumentou o tamanho dos nódulos obtendo maior colonização bacteriana em comparação com o patógeno sozinho (Buonaurio et al., 2015). Porém no caso da espécie *Pantoea vagans*, é apontada em estudos por ser capaz de controlar uma ampla gama de patógenos de plantas (Walterson et al., 2015). A diversidade, estilo de vida e associação das bactérias endofíticas até este momento é uma incógnita, necessitando estudos e análises aprofundadas para obtenção de um quadro completo das suas atividades (Oukala et al., 2021).

## **5.2 Isolamento bacteriófago e sua eficiência no controlo da tuberculose**

A identificação de fagos como parte de uma estratégia de controlo biológico tem sido considerada uma estratégia eficaz para reduzir significativamente a contaminação por patógenos bacterianos. Porém uma das principais dificuldades na aplicação de bacteriófagos no controlo de fitopatógenos bacterianos na agricultura é a sua alta especificidade, infetando apenas estirpes específicas da bactéria alvo (Jones et al., 2012). Por isso é importante que no processo de pesquisa de bacteriófagos sejam utilizados vários isolados do mesmo agente patogénico. Adicionalmente, este problema pode ser parcialmente superado usando coquetéis de bacteriófagos. Esta estratégia tem sido usada com sucesso na indústria alimentícia (Sharma, 2013) e na veterinária (Sommer et al.,

2019). No entanto, esta especificidade é considerada por muitos como uma propriedade vantajosa no combate a bactérias quando comparada com os antibióticos que exibem largo espectro (Forde & Hill, 2018). Por outro lado, os fagos não afetam o hospedeiro infetado nem a comunidade microbiana normalmente existente, uma vez que a sua atividade cessa quando a espécie bacteriana morre (Forde & Hill, 2018).

De acordo com Stefani et al. (2021), existem vários produtos à base de bacteriófagos disponíveis no mercado. O primeiro produto autorizado na agricultura foi o AgriPhage (Omnilytics) desenvolvido contra a mancha bacteriana do tomate e pimentão (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). Outra empresa, desenvolveu o XylPhi-PD, que contém bacteriófagos que infetam a *Xylella fastidiosa*, o agente causal da doença de Pierce da uva. Na Europa, existem duas empresas com biopesticidas à base de bacteriófagos registados: O Erwiphage® Plus usado no controlo da bactéria *Erwinia amylovora* na macieira e Biolyse® PB, contendo bacteriófagos para o controlo do crescimento bacteriano em batatas após serem embaladas na indústria alimentar.

No caso da tuberculose da oliveira (*Pss*), não há coleções de bacteriófagos caracterizados e disponíveis que possam ser preparados e usados no controlo biológico em condições de campo. No presente estudo foi possível o isolamento de 9 fagos específicos para *P. savastanoi* pv. *savastanoi* que produziram zonas claras indicativas da lise bacteriana. Todos estes fagos foram isolados do solo do olival onde se estudou a comunidade bacteriana endofítica, pelo contrário, não foram detetados fagos específicos para *P. savastanoi* pv. *savastanoi* nas amostras de solo colhidas na floresta. Estes resultados sugerem que a presença da bactéria patogénica no olival amostrado faz das mesmas uma fonte importante para o isolamento de vários bacteriófagos. De entre os diferentes fagos obtidos, um deles mostrou reduzir de forma eficaz o crescimento do patogénico em condições *in vitro*. Resultado similar é encontrado no estudo de Marei (2020), quando avaliou a eficácia de fagos virulentos específicos para a *Pseudomonas aeruginosa* como controlo biológico em condições de laboratório, tendo também obtido formações de placas de lise em placa de Petri.

A eficiência do isolado fágico selecionado no controlo da tuberculose foi avaliada utilizando um bioensaio com cenoura. Devido às características inerentes das plantas lenhosas e de vida longa, investigar o mecanismo de ação na aplicação de fagos pode levar mais tempo e esforço. O uso de explantes de plantas hospedeiras jovens são geralmente usados em testes de patogenicidade de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, embora

geralmente leve algum tempo para produzir resultados se testado um grande número de isolados. Assim, a utilização de plantas de vida curta ou bioensaios com órgãos de plantas apresenta-se como uma alternativa estratégica, com maior facilidade de execução permitindo a obtenção de resultados de forma rápida.

Os resultados deste trabalho em fatias de cenoura não apresentaram diferenças significativas entre amostras do patógeno inoculadas com ou sem fago, havendo a necessidade de repetir o teste com o ajuste de volumes de bacteriófagos para um determinado volume de *Pss* e número de repetições. Porém o trabalho de Filiz & Bozkurt (2020) com inoculação em fatias de cenoura, obteve sucesso ao avaliar a patogenicidade de *Pss*, assim como determinar o potencial de bactérias antagonistas para o controlo biológico *in vivo* (Filiz & Bozkurt, 2022). Outro resultado semelhante é encontrado no estudo de Czajkowski (2016), onde misturas de fagos foram testadas em fatias de batata em ambiente controlado, com o objetivo de observar a capacidade das misturas de fagos como controlo para as múltiplas espécies de patógenos associadas à doença da podridão mole da batata (*Pectobacterium spp.* e *Dickeya spp.*). Pelo facto de as avaliações serem apenas visuais, há necessidade de um maior aprofundamento da anatomia e modo de vida dos fagos para futuras utilizações estratégicas e eficientes.

## 6. CONCLUSÕES

As doenças que atacam plantas agrícolas continuam a gerar impacto na produção de alimentos em todo mundo e novas abordagens de controlo são constantemente procuradas. Estratégias alternativas de base biológica para o controlo de patógenos de plantas baseadas, por exemplo, em bactérias antagonistas e fagos estão sendo desenvolvidas e apontadas como estratégias promissoras.

Neste estudo foi possível analisar a comunidade bacteriana de ramos com e sem sintomas da doença tuberculose-da-oliveira de oliveiras centenárias, por dois métodos distintos de isolamento (explante e maceração), no qual se obteve-se uma maior diversidade de isolados no método de maceração, onde ambos geraram diferenças ao nível das comunidades bacterianas obtidas. Verificou-se que as comunidades bacterianas dos ramos sintomáticos foram mais diversas e abundantes quando comparado com os ramos assintomáticos. Ramos sintomáticos são mais diversos e abundantes em *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Curtobacterium*, face aos assintomáticos. Não foi possível a confirmação das espécies dos isolados adquiridos do género *Pseudomonas*, sendo necessária a identificação utilizando outros marcadores moleculares.

Através de amostras de solo do olival, foi possível isolar 9 bacteriófagos, que quando testados *in vitro* possibilitou a inibição da severidade da doença causada pelo patógeno *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, que indica ser uma alternativa promissora a ser estudada contra a tuberculose-da-oliveira. O fago selecionado para a inoculação em fatias de cenoura, ao ser comparado estatisticamente com as fatias inoculadas somente com *Pss*, não demonstrou diferenças significativas, surgindo a necessidade de uma revisão do protocolo aplicado. No caso dos fagos adquiridos durante este estudo, uma alternativa é a realização de uma análise mais complexa para elaborar novos protocolos e testes que possibilitem a inserção em ensaios *in planta*. O estudo de fagos na luta contra a tuberculose-da-oliveira não só ajudará a resolver o problema causado por esta doença, mas também permitirá esclarecer a biologia dos fagos e a relação com o seu hospedeiro bacteriano para melhoramento de resultados futuros. Embora as árvores lenhosas, como a oliveira, representem desafios para o desenvolvimento de estratégias de controlo biológico devido ao seu porte e vida útil relativamente longo, os conceitos existentes desenvolvidos em pequenas culturas de curta duração podem ser transferidos futuramente para o controlo biológico da árvore hospedeira.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abuamsha, R., Abueid, M., Hajjeh, H., & Salman, M. (2013). Evaluation of the Incidence and Severity of Olive Leaf Spot caused by *Spilocaea oleaginain* different olive cultivars in Palestine. *Journal of Agriculture and Environment for International Development (JAEID)*, 107(2), 201-212.
- Baldoni, L., & Belaj, A. (2009). Oil crops. *Oil Crops, Handbook of Plant Breeding*, 4, 397-421.
- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J. M., Fromin, N., Degraeve S., et al. (2000). *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 9–18. doi: 10.1099/00207713-50-1-9
- Almeida, R. P. (2018). Emerging plant disease epidemics: Biological research is key but not enough. *PLoS biology*, 16(8), e2007020.
- Barranco, D., Navero, D. B., & Romero, L. R. (2008). *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa.
- BARRANCO NAVERO, DIEGO, FERNANDEZ ESCOBAR, RICARDO & RALLO ROMERO, LUIS (2017). *O Cultivo da Oliveira 7ª ed.* Livros Mundi-Press.
- Behlau, F., Canteros, B. I., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2012). Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 949-963.
- Beltran-Garcia, M. J., White Jr, J. F., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S., ... & Di Mascio, P. (2014). Nitrogen acquisition in Agave tequilana from degradation of endophytic bacteria. *Scientific reports*, 4(1), 1-7.
- Berg, G., & Raaijmakers, J. M. (2018). Saving seed microbiomes. *The ISME journal*, 12(5), 1167-1170.
- Bernardo, P., Charles-Dominique, T., Barakat, M., Ortet, P., Fernandez, E., Filloux, D., ... & Roumagnac, P. (2018). Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of plant viruses at the ecosystem scale. *The ISME journal*, 12(1), 173-184.
- Bizos, G., Papatheodorou, E. M., Chatzistathis, T., Ntalli, N., Aschonitis, V. G., & Monokrousos, N. (2020). The role of microbial inoculants on plant protection,

- growth stimulation, and crop productivity of the olive tree (*Olea europea* L.). *Plants*, 9(6), 743.
- Böhm, J. (2013) A história da oliveira em cultura. Em: Böhm, J. (Org). O Grande Livro da Oliveira e do Azeite. Portugal Oleícola. *Dinalivro Editora*, Lisboa, 120-288 pp.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34, 100622.
- Bouaichi, A., Benkirane, R., Habbadi, K., Benbouazza, A., & Achbani, E. H. (2015). Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causal agent of olive knot. *J Agric Vet Sci*, 8(12), 41-5.
- Bouaichi, A., Benkirane, R., El-kinany, S., Habbadi, K., Lougraimzi, H., Sadik, S., ... & Achbani, E. H. (2021). Potential effect of antagonistic bacteria in the management of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 1035-1040.
- Bracci T, Busconi M, Fogher C, Sebastiani L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): Overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports* 30: 449-462.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., ... & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell host & microbe*, 17(3), 392-403.
- Buonaurio, R., Moretti, C., da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., & Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in plant science*, 6, 434.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in microbiology*, 8, 34.

- Cabanás, C. G. L., Sesmero, R., Valverde-Corredor, A., Javier López-Escudero, F., & Mercado-Blanco, J. (2017). A split-root system to assess biocontrol effectiveness and defense-related genetic responses in above-ground tissues during the tripartite interaction *Verticillium dahliae*-olive-*Pseudomonas fluorescens* PICF7 in roots. *Plant and Soil*, 417(1), 433-452.
- Campisano, A., Pancher, M., Puopolo, G., Puddu, A., Lòpez-Fernàndez, S., Biagini, B., ... & Pertot, I. (2015). Diversity in endophyte populations reveals functional and taxonomic diversity between wild and domesticated grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 12-21.
- Casey, E., Van Sinderen, D., & Mahony, J. (2018). In vitro characteristics of phages to guide 'real life' phage therapy suitability. *Viruses*, 10(4), 163.
- Castrignanò, A., Belmonte, A., Antelmi, I., Quarto, R., Quarto, F., Shaddad, S., ... & Nigro, F. (2021). A geostatistical fusion approach using UAV data for probabilistic estimation of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* infection in olive trees. *Science of the Total Environment*, 752, 141814.
- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future microbiology*, 8(6), 769-783.
- Clavijo-Coppens, F., Ginet, N., Cesbron, S., Briand, M., Jacques, M. A., & Ansaldi, M. (2021). Novel Virulent Bacteriophages Infecting Mediterranean Isolates of the Plant Pest *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas albilineans*. *Viruses*, 13(5), 725.
- Cernava, T., Aschenbrenner, I. A., Grube, M., Liebming, S., and Berg, G. (2015). A novel assay for the detection of bioactive volatiles evaluated by screening of lichen-associated bacteria. *Front. Microbiol.* 6:398. doi: 10.3389/fmicb.2015.00398.
- Colombi, E., Straub, C., Künzel, S., Templeton, M. D., McCann, H. C., & Rainey, P. B. (2017). Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids. *Environmental Microbiology*, 19(2), 819-832.
- Comai, L. U. C. A., & Kosuge, T. S. U. N. E. (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, 143(2), 950-957.

- Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2019). Ecology and evolution of plant microbiomes. *Annual review of microbiology*, 73, 69-88.
- Correia, P. K. M. (2007). *Diversidade molecular em estirpes de Pseudomonas savastanoi isoladas de nódulos de Olea europaea L. portuguesa* (Master's thesis, Universidade de Évora).
- Czajkowski, R. (2016). Bacteriophages of soft rot Enterobacteriaceae—a minireview. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2), fnv230.
- Dandekar, A. A., Chugani, S., & Greenberg, E. P. (2012). Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. *Science*, 338(6104), 264-266.
- da Silva, D. P., Castañeda-Ojeda, M. P., Moretti, C., Buonauro, R., Ramos, C., & Venturi, V. (2014). Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease. *Microbiology*, 160(3), 556-566.
- Dong, W., Li, E., Liu, Y., Xu, C., Wang, Y., Liu, K., ... & Zhou, S. (2022). Phylogenomic approaches untangle early divergences and complex diversifications of the olive plant family. *BMC biology*, 20(1), 1-25.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Jabborova, D., Räsänen, L. A., & Liao, H. (2017). Coordination between Bradyrhizobium and Pseudomonas alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 100-107.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y. I., Morisaki, H., ... & Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil science and plant nutrition*, 46(3), 617-629.
- Elmagzob, A. A. H., Ibrahim, M. M., & Zhang, G. F. (2019). Seasonal diversity of endophytic bacteria associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. *Diversity*, 11(7), 112.
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 5, 327-349.

- Escudero-Martinez, C., & Bulgarelli, D. (2019). Tracing the evolutionary routes of plant–microbiota interactions. *Current opinion in microbiology*, 49, 34-40.
- Fabbri, A., & Benelli, C. (2000). Review Article Flower bud induction and differentiation in olive. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(2), 131-141.
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: a review. *Journal of microbiological methods*, 170, 105860.
- FAOSTAT (2022). Agricultural Statistics - Crops - <http://www.fao.org/faostat>, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farooq, T., Hussain, M. D., Shakeel, M. T., Tariqjaveed, M., Aslam, M. N., Naqvi, S. A. H., ... & He, Z. (2022). Deploying Viruses against Phytobacteria: Potential Use of Phage Cocktails as a Multifaceted Approach to Combat Resistant Bacterial Plant Pathogens. *Viruses*, 14(2), 171.
- Fernandes, S., & São-José, C. (2018). Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. *Viruses*, 10(8), 396.
- Fernandez-Escobar, R.; Gómez, J.A.; Quesda-Moraga, E.; Orgaz, F.; Trapero, A. & Rosa, R. (2017) - Sistemas de Produção em Olivicultura. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R. & Rallo, L. (Ed) - El cultivo del olivo. 7ª ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.
- Fernández, L., Gutiérrez, D., García, P., & Rodríguez, A. (2019). The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide. *Antibiotics*, 8(3), 126.
- Filiz Doksöz, S., & Bozkurt, I. A. (2020). A new and simple pathogenicity test using carrot slices for *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal disease agent of olive knot. *Journal of Plant Pathology*, 102(4).
- FİLİZ DOKSÖZ, S., & Bozkurt, I. A. (2022). Biological control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing the olive knot disease with epiphytic and endophytic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 104(1), 65-78.
- Forde, A., & Hill, C. (2018). Phages of life—the path to pharma. *British Journal of Pharmacology*, 175(3), 412-418.

- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70.
- Gašić, K., Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Šević, M., & Obradović, A. (2018). Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot. *Frontiers in microbiology*, 2021.
- Gebru, E., Lee, J. S., Son, J. C., Yang, S. Y., Shin, S. A., Kim, B., ... & Park, S. C. (2010). Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of animal science*, 88(12), 3880-3886.
- Ghanney, N., Locantore, P., Nahdi, S., Ferchichi, A., & Iacobellis, N. S. (2016). Potential biocontrol effect of the phylloplane bacterium *Bacillus mojavensis* ABC-7 on the olive knot disease. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7(3).
- Godena, S., Dminić, I., & Đermić, E. (2012). Differential susceptibility of olive varieties to olive knot disease in Istria. *Journal of Central European Agriculture*, 13(1), 85-94.
- Gomes, S., Martins-Lopes, P., & Guedes-Pinto, H. (2012). Olive tree genetic resources characterization through molecular markers. In M. Caliskan, (Ed.), *Genetic diversity in plants*, (pp. 15–29). Rijeka: InTech Publication.
- Gomes, T., Pereira, J. A., Lino-Neto, T., Bennett, A. E., & Baptista, P. (2019). Bacterial disease induced changes in fungal communities of olive tree twigs depend on host genotype. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Gomez-Lama Cabanas, C., Legarda, G., Ruano-Rosa, D., Pizarro-Tobias, P., Valverde-Corredor, A., Niqui, J. L., ... & Mercado-Blanco, J. (2018a). Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: From the host roots to the bacterial genomes. *Frontiers in microbiology*, 9, 277.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Ruano-Rosa, D., Legarda, G., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Triviño, J. C., ... & Mercado-Blanco, J. (2018b). Bacillales members

- from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture*, 8(7), 90.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6:214. doi: 10.3389/fmicb.2015.00214
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., Garcia-Valdes, E., & Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in microbiology*, 8, 2422.
- Goodridge, L. D., & Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3), 130-137.
- Grace, E. R., Rabiey, M., Friman, V. P., & Jackson, R. W. (2021). Seeing the forest for the trees: Use of phages to treat bacterial tree diseases. *Plant Pathology*, 70(9), 1987-2004.
- Haines, M. E., Hodges, F. E., Nale, J. Y., Mahony, J., Van Sinderen, D., Kaczorowska, J., ... & Clokie, M. R. (2021). Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria. *Frontiers in microbiology*, 12, 564.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia electronica*, 4(1), 9.
- Harper, D. R. (2018). Criteria for selecting suitable infectious diseases for phage therapy. *Viruses*, 10(4), 177.
- Harshitha, K. N., Manoranjitham, S. K., Somasundaram, E., Rajendran, L., & Karthikeyan, G. (2018). Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* (Hingorani and Singh) Vauterin et al. and isolation of Xap specific bacteriophage. *Madras Agric. J*, 105(4-6), 210.
- Hassani, M. A., Özkurt, E., Seybold, H., Dagan, T., & Stukenbrock, E. H. (2019). Interactions and coadaptation in plant metaorganisms. *Annual review of phyt pathology*, 57, 483-503.

- Hassani, M. A., Özkurt, E., Franzenburg, S., & Stukenbrock, E. H. (2020). Ecological assembly processes of the bacterial and fungal microbiota of wild and domesticated wheat species. *Phytobiomes Journal*, 4(3), 217-224.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, 1(4), 298-303.
- Henderson, P. A., & Seaby, R. M. H. (2007). Community analysis package 4.0. Pisces Conservation Ltd, Lymington, UK.
- Hendrix, R. W. (2008). Phage evolution, in *Bacteriophage Ecology*, S.T. Abedon. Ed, pp. 177-194, Cambridge University Press, UK
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 624-653.
- Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and evolution*, 4(8), 1199-1208.
- Holtappels, D., Fortuna, K., Lavigne, R., Wagemans, J. (2021) The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. *Current Opinion in Biotechnology* 68, 60-71
- Hosni, T., Moretti, C., Devescovi, G., Suarez-Moreno, Z. R., Fatmi, M. B., Guarnaccia, C., ... & Venturi, V. (2011). Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *The ISME journal*, 5(12), 1857-1870. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.65>
- Hung, P. Q., Kumar, S. M., Govindsamy, V., & Annapurna, K. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biology and Fertility of Soils*, 44(1), 155-162.
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2012). Smaller fleas: viruses of microorganisms. *Scientifica*, 2012.

- INE, 2019. Main Crops Yield (kg/ Ha) by Geographic Localization (Agrarian Region) and Specie; Annual - <https://www.ine.pt/>, Instituto Nacional De Estatística, I.P.
- Janczuk-Richter, M., Marinović, I., Niedziółka-Jönsson, J., & Szot-Karpińska, K. (2019). Recent applications of bacteriophage-based electrodes: A mini-review. *Electrochemistry Communications*, 99, 11-15.
- Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., & Momol, M. T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4), e23857.
- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., & Sundin, G. W. (2007). Pseudomonas syringae diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant disease*, 91(1), 4-17.
- Kim, H., Lee, K. K., Jeon, J., Harris, W. A., & Lee, Y. H. (2020). Domestication of Oryza species eco-evolutionarily shapes bacterial and fungal communities in rice seed. *Microbiome*, 8(1), 1-17.
- Krid, S., Triki, M. A., Gargouri, A., & Rhouma, A. (2012). Biocontrol of olive knot disease by Bacillus subtilis isolated from olive leaves. *Annals of microbiology*, 62(1), 149-154.
- Koskella, B., & Taylor, T. B. (2018). Multifaceted impacts of bacteriophages in the plant microbiome. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 361-380.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Leitner, L., Kessler, T. M., & Klumpp, J. (2020). Bacteriophages: a panacea in neuro-urology? *European urology focus*, 6(3), 518-521.
- Lopes, J. I., & Pinto J. F. S. (2010). Tuberculose da oliveira. Direção Regional e Agricultura de pescas do Norte, ficha técnica número 35: 1-3.
- Maldonado-González, M. M., Prieto, P., Ramos, C., & Mercado-Blanco, J. (2013). From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte Pseudomonas fluorescens PICF 7 and the pathogen Pseudomonas savastanoi NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial biotechnology*, 6(3), 275-287.

- Marei, E. M. (2020). Isolation and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and its Virulent Bacteriophages. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 23(4), 491-500.
- McCune, B., Grace, J. B., & Urban, D. L. (2002). Analysis of ecological communities (Vol. 28). Gleneden Beach, OR: MjM software design.
- Mefteh, F. B., Daoud, A., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Rateb, M. E., ... & Belbahri, L. (2017). Fungal root microbiome from healthy and brittle leaf diseased date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.) reveals a hidden untapped arsenal of antibacterial and broad spectrum antifungal secondary metabolites. *Frontiers in microbiology*, 8, 307.
- Méthé, B. A., Nelson, K. E., Pop, M., Creasy, H. H., Giglio, M. G., Huttenhower, C., ... & Mannon, P. J. (2012). A framework for human microbiome research. *nature*, 486(7402), 215
- Mina, D., Pereira, J. A., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2020a). Screening the olive tree phyllosphere: search and find potential antagonists against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Frontiers in microbiology*, 2051.
- Mina, D., Pereira, J. A., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2020b). Impact of plant genotype and plant habitat in shaping bacterial pathobiome: a comparative study in olive tree. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in applied microbiology*, 51(4), 363-369.
- Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2008). Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant disease*, 92(10), 1421-1426.
- Moretti, C., Ferrante, P., Hosni, T., Valentini, F., D'Onghia, A., & Buonauro, R. (2008). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains collected from olive trees in different countries. In *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens—Identification, Epidemiology and Genomicz* (pp. 321-329). Springer, Dordrecht.

- Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS microbiology ecology*, 87(1), 2-17.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Nagai, H., Miyake, N., Kato, S., Maekawa, D., Inoue, Y., & Takikawa, Y. (2017). Improved control of black rot of broccoli caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a bacteriophage and a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain. *Journal of General Plant Pathology*, 83(6), 373-381.
- Nester, E. W., & Kosuge, T. (1981). Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annual Reviews in Microbiology*, 35(1), 531-565.
- Nguyen, K. A., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2017). Quaternary ammonium compounds as new sanitizers for reducing the spread of the olive knot pathogen on orchard equipment. *Plant disease*, 101(7), 1188-1193.
- Nguyen, K.A., Förster, H., Adaskaveg, J.E. (2018a) Genetic diversity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in California and characterization of epidemiological factors for olive knot development. *Plant Disease* 102(9), 1718-1724.
- Nguyen, K. A., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2018b). Efficacy of copper and new bactericides for managing olive knot in California. *Plant disease*, 102(5), 892-898.
- Öksel, C., & MİRİK, M. (2015). Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı in vitro koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkis. *Bitki Koruma Bülteni*, 55(4).
- Oukala, N., Aissat, K., & Pastor, V. (2021). Bacterial endophytes: The hidden actor in plant immune responses against biotic stress. *Plants*, 10(5), 1012.
- Partida-Martinez, L. P. P., & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in plant science*, 2, 100.
- Peel, M.C., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. & Rubel, F. (2007) Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. *Meteorologische Zeitschrift*, 15, 259–263.

- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., & López, M. M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2673-2677.
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J. M., Salcedo, C. I., ... & López, M. M. (2006). Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, *96*(3), 313-319.
- Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M., & Raaijmakers, J. M. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, *6*(1), 1-6.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). Springer, New York, NY.
- Ponti, L., Gutierrez, A. P., Ruti, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(15), 5598-5603.
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B., & Mercado-Blanco, J. (2011). Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial ecology*, *62*(2), 435-445.
- Quesada, J. M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C. I., Carbonell, E. A., & López, M. M. (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, *59*(2), 262-269.
- 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*. *Plant Pathology*, 299-326.
- Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular plant pathology*, *13*(9), 998-1009.

- Reis P. (2014). O olival em Portugal: Dinâmicas, tecnologias e relação com o desenvolvimento rural, Animar - Associação Portuguesa para o Desenvolvimento Local, Lisboa.
- Richard, D., Ravigné, V., Rieux, A., Facon, B., Boyer, C., Boyer, K., ... & Lefeuvre, P. (2017a). Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Molecular Ecology*, 26(7), 2131-2149.
- Richard, D., Tribot, N., Boyer, C., Terville, M., Boyer, K., Javegny, S., ... & Vernière, C. (2017b). First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker in Réunion, France. *Plant Disease*, 101(3), 503.
- Roach, D. R., & Debarbieux, L. (2017). Phage therapy: awakening a sleeping giant. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(1), 93-103.
- Rodríguez-Moreno, L., Jiménez, A. J., & Ramos, C. (2009). Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microbial biotechnology*, 2(4), 476-488.
- Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., ... & Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental microbiology*, 17(2), 316-331.
- Rombouts, S., Volckaert, A., Venneman, S., Declercq, B., Vandenneuvel, D., Allonsius, C. N., ... & Lavigne, R. (2016). Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Frontiers in microbiology*, 7, 279.
- Romero Azogil, A. (2017). Hongos y otros parásitos del olivo (*Olea europaea* L.).
- Sanei, S. J., & Razavi, S. E. (2011). Suppression of *Verticillium* wilt of olive by *Pseudomonas fluorescens*. *American Journal of Experimental Agriculture*, 1(4), 294.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.

- Scharf, B. E., Hynes, M. F., & Alexandre, G. M. (2016). Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant molecular biology*, 90(6), 549-559.
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., & Mercado-Blanco, J. (2012). Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLoS One*, 7(11), e48646.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., & Salerno, M. (2004). Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant pathology*, 53(4), 491-497.
- Sebastiani, L., & Busconi, M. (2017). Recent developments in olive (*Olea europaea* L.) genetics and genomics: applications in taxonomy, varietal identification, traceability and breeding. *Plant Cell Reports*, Vol. 36, 1345–1360 <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2145-9>
- Sharma, M. (2013). Lytic bacteriophages: potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce. *Bacteriophage*, 3(2), e25518.
- Sillankorva, S. (2018). Isolation of bacteriophages for clinically relevant bacteria. In *Bacteriophage Therapy* (pp. 23-30). Humana Press, New York, NY.
- Soldan, R., Fusi, M., Cardinale, M., Daffonchio, D., & Preston, G. M. (2021). The effect of plant domestication on host control of the microbiota. *Communications Biology*, 4(1), 1-9.
- Sommer, J., Trautner, C., Witte, A. K., Fister, S., Schoder, D., Rossmann, P., & Mester, P. J. (2019). Don't shut the stable door after the phage has bolted—The importance of bacteriophage inactivation in food environments. *Viruses*, 11(5), 468.
- Sousa, D. (2020). ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COM FOCO NA SUA UTILIZAÇÃO PARA CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO.
- Stefani, E., Obradović, A., Gašić, K., Altin, I., Nagy, I. K., & Kovács, T. (2021). Bacteriophage-mediated control of phytopathogenic xanthomonads: A promising green solution for the future. *Microorganisms*, 9(5), 1056.

- Stone, E., Campbell, K., Grant, I., & McAuliffe, O. (2019). Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses*, *11*(6), 567.
- Su, F., Jacquard, C., Villaume, S., Michel, J., Rabenoelina, F., Clément, C., ... & Vaillant-Gaveau, N. (2015). Burkholderia phytofirmans PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science*, *6*, 810.
- Sun, X., Kosman, E., & Sharon, A. (2020). Stem endophytic mycobiota in wild and domesticated wheat: structural differences and hidden resources for wheat improvement. *Journal of Fungi*, *6*(3), 180.
- Sundin, G. W., & Wang, N. (2018). Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of phytopathology*, *56*, 161-180.
- Surico, G., Iacobellis, N. S., & Sisto, A. (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by Pseudomonas syringae pv. savastanoi. *Physiological Plant Pathology*, *26*(3), 309-320.
- Tarakanov, R. I., Lukianova, A. A., Evseev, P. V., Toshchakov, S. V., Kulikov, E. E., Ignatov, A. N., ... & Dzhililov, F. S. U. (2022). Bacteriophage Control of Pseudomonas savastanoi pv. glycinea in Soybean. *Plants*, *11*(7), 938.
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2013). Interspecies interaction between Pseudomonas aeruginosa and other microorganisms. *Microbes and environments*, *28*(1), 13-24.
- Ting, A. S. Y. (2014). Biosourcing endophytes as biocontrol agents of wilt diseases. In *Advances in endophytic research* (pp. 283-300). Springer, New Delhi.
- Tous, J., Romero, A., & Hermoso, J. F. (2007). The hedgerow system for olive growing. *Olea (FAO Olive Network)*, *26*, 20-26.
- Tous, J., Hermoso, J. F., & Romero, A. (2010). New trends in olive orchard design for continuous mechanical harvesting. *New Trends in Olive Orchard Design for Continuous Mechanical Harvesting*, 1000-1010.

- Valverde, P., Zucchini, M., Polverigiani, S., Lodolini, E. M., López-Escudero, F. J., & Neri, D. (2020). Olive knot damages in ten olive cultivars after late-winter frost in central Italy. *Scientia Horticulturae*, 266, 109274.
- Vuletin Selak, G., Raboteg, M., Fournier, P., Dubost, A., Abrouk, D., Žanić, K., ... & Pujić, P. (2019). Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain ST1, Isolated from Olive (*Olea europaea* L.) Knot Galls in Croatia. *Microbiology Resource Announcements*, 8(46), e00986-19.
- Vuletin Selak, G., Raboteg, M., Dubost, A., Abrouk, D., Žanić, K., Normand, P., & Pujić, P. (2019). Whole-genome sequence of a *Pantoea* sp. strain isolated from an olive (*Olea europaea* L.) knot. *Microbiology resource announcements*, 8(42), e00978-19.
- Walterson, A. M., & Stavriniades, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS microbiology reviews*, 39(6), 968-984.
- Weitz, J. S., Poisot, T., Meyer, J. R., Flores, C. O., Valverde, S., Sullivan, M. B., & Hochberg, M. E. (2013). Phage–bacteria infection networks. *Trends in microbiology*, 21(2), 82-91.
- White, H. E., & Orlova, E. V. (2019). Bacteriophages: their structural organisation and function. *Bacteriophages-Perspectives and Future*.
- White, J. F., Kingsley, K. L., Verma, S. K., & Kowalski, K. P. (2018). Rhizophagy cycle: an oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. *Microorganisms*, 6(3), 95.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226-235.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(8), 3327-3340.

- Young, J. M. (2004). Olive knot and its pathogens. *Australasian Plant Pathology*, 33(1), 33-39. <https://doi.org/10.1071/AP03074>
- Xu, W., Wang, F., Zhang, M., Ou, T., Wang, R., Strobel, G., ... & Xie, J. (2019). Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. *Microbiological research*, 229, 126328.
- Zaczek-Moczyłowska, M. A., Young, G. K., Trudgett, J., Fleming, C. C., Campbell, K., & O'Hanlon, R. (2020). Genomic Characterization, Formulation and Efficacy in Planta of a Siphoviridae and Podoviridae Protection Cocktail against the Bacterial Plant Pathogens *Pectobacterium* spp. *Viruses*, 12(2), 150.

## **8. ANEXOS**

**Tabela S 1.** Resultados do BLAST para os isolados em estudo.

		Database (nr)					ITS Type material				
Código da amostra	Cód. Orig.	Query Cover	E value	Per. Ident (%)	Accession	Classificação	Query Cover	E value	Per. Ident (%)	Accession n	Classificação Tree
<b>CIMO 21MC014</b>	A6	100	0	99,78	MT25618 8.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	0	99,57	NR11782 2.1	<i>Pseudomonas sp.5</i>
<b>CIMO 21MC017</b>	A9	100	0	100	MH33799 4.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	0	99,56	CP07700 91.1	<i>Pseudomonas sp.4</i>
<b>CIMO 21MC025</b>	A19	100	0	100	MT42220 8.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	0	99,76	MT56143 8.1	<i>Pseudomonas sp.2</i>
<b>CIMO 21MC027</b>	A21	100	0	98,87	MN30736 0.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	0	98,65	MT56143 8.1	<i>Pseudomonas sp.3</i>
<b>CIMO 21MC045</b>	A33	100	0	99,76	MK55994 8.1	<i>Pseudomonas</i>	100	0	96,94	MF55463 1.1	<i>Pseudomonas sp.1</i>
<b>CIMO 21MC005</b>	B6	100	0	100	FN42171 4.1	<i>Pseudomonas</i>	100	0	99,78	NR11782 2.1	<i>Pseudomonas sp.6</i>
<b>CIMO 21MC066</b>	C8	100	0	99,78	LC18917 7.1	<i>Pseudomonas</i>	100	0	99,57	NR11782 2.1	<i>Pseudomonas sp.7</i>
<b>CIMO 21MC069</b>	C11	100	0	99,78	LC18917 7.1	<i>Pseudomonas</i>	100	0	99,57	NR11782 2.1	<i>Pseudomonas sp.8</i>
<b>CIMO 21MC011</b>	A2	100	7e - 176	99,14	NR_1048 28.1	<i>Erwinia</i>	100	3e - 177	99,14	NR10482 8.1	<i>Erwinia cf. toletana</i>

<b>CIMO 21MC016</b>	A8	100	0	100	NR_0426 93.1	<i>Agrococcus versicolor</i>	100	0	100	NR04269 3.1	<i>Agrococcus sp.3</i>
<b>CIMO 21MC018</b>	A10	100	0	99,79	MG73395 1.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	98,72	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.14</i>
<b>CIMO 21MC019</b>	A12	100	0	100	KJ482851 .1	<i>Stenotrophomonas</i>	100	0	97,83	NR11636 6.1	<i>Stenotrophomonas cf. chelatiphaga</i>
<b>CIMO 21MC020</b>	A14	100	6e - 84	99,44	MT36019 6.1	<i>Pantoea</i>	100	1e - 83	98,88	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.16</i>
<b>CIMO 21MC021</b>	A15	100	0	100	MN88928 2.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	99,77	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.3</i>
<b>CIMO 21MC022</b>	A16	98	0	98,61	MN30996 9.1	<i>Bacillus cereus</i>	98	1e - 180	98,34	MT42192 5.1	<i>Bacillus cf. wiedmannii</i>
<b>CIMO 21MC023</b>	A17	100	0	99,55	MN82658 4.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	99,55	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.7</i>
<b>CIMO 21MC024</b>	A18	100	0	100	MN82658 4.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	100	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.5</i>
<b>CIMO 21MC026</b>	A20	100	0	100	MN82658 4.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	100	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.4</i>
<b>CIMO 21MC029</b>	A23	99	0	98,22	MW4665 50.1	<i>Curtobacterium glycinis</i>	99	0	98,22	MW4665 50.1	<i>Curtobacterium cf. glycinis</i>
<b>CIMO 21MC038</b>	A24	100	0	100	NR_0254 62.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	100	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.1</i>

<b>CIMO 21MC030</b>	A26	100	7e - 145	100	MN92282 0.1	<i>Pantoea vagans</i>	100	1e - 144	99,65	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.17</i>
<b>CIMO 21MC040</b>	A27	100	0	100	MN31486 6.1	<i>Curtobacterium pusillum</i>	96	0	100	MT76000 2.1	<i>Curtobacterium sp.5</i>
<b>CIMO 21MC031</b>	A29-1	99	0	99,3	NR_0426 93.1	<i>Agrococcus versicolor</i>	100	0	99,76	NR04269 3.1	<i>Agrococcus sp.1</i>
<b>CIMO 21MC032</b>	A29-2	100	0	99,76	NR_0426 93.1	<i>Agrococcus versicolor</i>	99	0	99,3	NR04269 3.1	<i>Agrococcus sp.2</i>
<b>CIMO 21MC033</b>	A32	100	0	100	MN75882 4.1	<i>Microbacterium foliorum</i>	100	0	100	MW5783 84.1	<i>Microbacterium cf. foliorum</i>
<b>CIMO 21MC047</b>	A35	99	2e - 46	85,56	CP038853 .1	<i>Pantoea</i>	99	2e - 46	85,56	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.10</i>
<b>CIMO 21MC048</b>	A36	100	0	99,3	NR_0247 55.1	<i>Okibacterium fritillariae</i>	100	0	99,3	NR02475 5.1	<i>Okibacterium sp.2</i>
<b>CIMO 21MC049</b>	B1	100	0	99,78	MK02681 4.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	98,93	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.13</i>
<b>CIMO 21MC001</b>	B2	98	0	99,75	JQ047368 .1	<i>Sphingomonas</i>	98	0	99,01	NR11826 3.1	<i>Sphingomonas cf. kyugheensis</i>
<b>CIMO 21MC002</b>	B3	100	0	99,76	MG94862 4.1	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	65	6e - 70	84,34	NR11581 2.1	<i>Mycoplasma cf. insons</i>

<b>CIMO</b> <b>21MC003</b>	B4	100	0	100	MK96712 5.1	<i>Staphylococcus</i>	100	0	100	MF67897 1.1	<i>Staphylococcus cf. warneri</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC004</b>	B5	99	0	98,12	MH37554 8.1	<i>Pantoea</i>	99	0	98,12	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.2</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC006</b>	B7	100	0	100	MT36024 6.1	<i>Fron dihabitans</i>	99	0	96,85	NR12564 4.1	<i>Fron dihabitans sp.1</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC007</b>	B8	99	0	100	MT39719 6.1	<i>Curtobacterium</i>	99	0	99,04	NR11606 4.1	<i>Curtobacterium cf. oceanosedimentum</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC009</b>	B10	99	0	99,28	JF181266. 1	<i>Methylobacterium</i>	99	0	98,55	NR04102 6.1	<i>Methylobacterium cf. mesophilicum</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC010</b>	B11	100	0	100	MT27996 9.1	<i>Sphingomonas</i>	100	0	99,76	NR04213 0.1	<i>Sphingomonas cf. aerolata</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC050</b>	B12	99	0	96,98	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	0	96,98	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.7</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC051</b>	B13	100	0	100	CP035094 .1	<i>Priestia</i>	100	0	100	CP03509 4.1	<i>Priestia cf. megaterium</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC052</b>	B14	100	0	98,05	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	98,05	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.1</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC053</b>	B15	100	0	100	MN62906 6.1	<i>Stenotrophomonas</i>	100	0	99,78	MT12632 7.1	<i>Stenotrophomonas sp.3</i>
<b>CIMO</b> <b>21MC054</b>	B16	100	0	100	NR_1217 39.1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	0	100	NR12173 9.1	<i>Stenotrophomonas cf. rhizophila</i>

<b>CIMO 21MC055</b>	B17	100	0	100	MN62906 6.1	<i>Stenotrophomonas</i>	100	0	99,78	MT12632 7.1	<i>Stenotrophomonas sp.4</i>
<b>CIMO 21MC057</b>	B19	100	0	99,34	NR_1217 39.1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	0	99,78	MT12632 7.1	<i>Stenotrophomonas sp.2</i>
<b>CIMO 21MC058</b>	B20	100	0	99,14	NR_1217 39.1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	0	99,57	MT12632 7.1	<i>Stenotrophomonas sp.1</i>
<b>CIMO 21MC059</b>	B21	100	0	100	NR_1456 21.1	<i>Pseudoclavibacter terrae</i>	100	0	100	NR14562 1.1	<i>Pseudoclavibacter cf. terrae</i>
<b>CIMO 21MC060</b>	C1	100	0	99,57	EU84910 8.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	98,92	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.9</i>
<b>CIMO 21MC062</b>	C3	99	0	100	NR_1048 39.1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	99	0	99,48	MW4665 50.1	<i>Curtobacterium sp.1</i>
<b>CIMO 21MC063</b>	C4	100	0	98,75	MW1112 05.1	<i>Curtobacterium herbarum</i>	100	0	98,75	MW1112 05.1	<i>Curtobacterium cf. herbarum</i>
<b>CIMO 21MC065</b>	C6	100	0	100	MN31486 6.1	<i>Curtobacterium pusillum</i>	96	0	100	MT76000 2.1	<i>Curtobacterium sp.4</i>
<b>CIMO 21MC067</b>	C9	100	0	100	NR_1048 39.1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	100	0	98,48	MW4665 50.1	<i>Curtobacterium sp.2</i>
<b>CIMO 21MC068</b>	C10	99	0	100	MH36649 3.2	<i>Arthrobacter</i>	99	0	99,06	NR13396 9.1	<i>Arthrobacter sp.1</i>

<b>CIMO 21MC070</b>	C12	100	0	100	MH36649 3.2	<i>Arthrobacter</i>	100	0	99,08	NR13396 9.1	<i>Arthrobacter sp.2</i>
<b>CIMO 21MC071</b>	C13	100	0	100	GU58499 3.1	<i>Okibacterium</i>	100	0	99,3	NR02475 5.1	<i>Okibacterium sp.1</i>
<b>CIMO 21MC072</b>	C14	100	0	99,5	MG73396 0.1	<i>Pantoea</i>	100	0	98,51	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.15</i>
<b>CIMO 21MC073</b>	C16	100	0	99,57	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	99,57	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.3</i>
<b>CIMO 21MC074</b>	C17	99	2e - 133	89,58	KF20277 7.1	<i>Pantoea</i>	99	2e - 46	85,56	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.8</i>
<b>CIMO 21MC075</b>	C18	100	0	100	MN81105 9.1	<i>Arthrobacter</i>	100	0	99,55	MH2361 28.1	<i>Arthrobacter cf. humicola</i>
<b>CIMO 21MC076</b>	C19	100	0	99,77	LN68156 9.1	<i>Curtobacterium pusillum</i>	96	0	100	MT76000 2.1	<i>Curtobacterium sp.3</i>
<b>CIMO 21MC077</b>	C20	100	0	99,77	NR_0254 62.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	99,77	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.2</i>
<b>CIMO 21MC078</b>	C21	100	0	99,77	LN68156 9.1	<i>Curtobacterium pusillum</i>	96	0	100	MT76000 2.1	<i>Curtobacterium cf. flaccumfaciens</i>
<b>CIMO 21MC079</b>	C22	100	0	100	MK42428 7.1	<i>Microbacterium foliorum</i>	100	0	100	MK4242 87.1	<i>Microbacterium cf. foliorum</i>
<b>CIMO 21MC080</b>	C23	100	0	98,22	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	98,27	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.6</i>
<b>CIMO 21MC081</b>	C24	100	3e - 141	99,64	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	3e - 136	98,56	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.11</i>

<b>CIMO 21MC082</b>	C25	99	0	99,78	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	0	99,78	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.5</i>
<b>CIMO 21MC083</b>	C26	100	0	99,35	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0	98,92	KJ65434 1.1	<i>Pantoea sp.12</i>
<b>CIMO 21MC084</b>	C27	100	0	100	MN36636 8.1	<i>Rhodococcus</i>	100	0	99,77	NR11912 6.1	<i>Rhodococcus cf. fascians</i>
<b>CIMO 21MC085</b>	C28	100	0	100	MK42429 2.1	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	100	0	100	MK4242 92.1	<i>Microbacterium cf. phyllosphaerae</i>
<b>CIMO 21MC086</b>	C29	100	0	100	NR_0254 62.1	<i>Plantibacter flavus</i>	100	0	100	NR02546 2.1	<i>Plantibacter sp.6</i>
<b>CIMO 21MC088</b>	C31	99	0	98,53	CP077366 .1	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	0	98,53	CP07736 6.1	<i>Pantoea sp.4</i>

**Tabela S 2.** Classificação dos isolados obtidos a partir de amostras endofíticas de ramos saudáveis de oliveira e nódulos causados pela doença tuberculose-da-oliveira.

<b>Reino</b>	<b>Filo</b>	<b>Classe</b>	<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>ID</b>	<b>Código CIMO</b>
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.5</i>	CIMO 21MC014
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.4</i>	CIMO 21MC017
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.2</i>	CIMO 21MC025
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.3</i>	CIMO 21MC027
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.1</i>	CIMO 21MC045
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.6</i>	CIMO 21MC005
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.7</i>	CIMO 21MC066
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.8</i>	CIMO 21MC069

Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	<i>Erwinia cf. toletana</i>	CIMO 21MC011
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus sp.3</i>	CIMO 21MC016
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.14</i>	CIMO 21MC018
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas cf. chelatiphaga</i>	CIMO 21MC019
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.16</i>	CIMO 21MC020
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.3</i>	CIMO 21MC021
Bactéria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus cf. wiedmannii</i>	CIMO 21MC022
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.7</i>	CIMO 21MC023
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.5</i>	CIMO 21MC024
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.4</i>	CIMO 21MC026
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium cf. glycinis</i>	CIMO 21MC029
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.1</i>	CIMO 21MC038
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.17</i>	CIMO 21MC030
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium sp.5</i>	CIMO 21MC040
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus sp.1</i>	CIMO 21MC031
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus sp.2</i>	CIMO 21MC032
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium cf. foliorum</i>	CIMO 21MC033
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.10</i>	CIMO 21MC047
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Okibacterium sp.2</i>	CIMO 21MC048
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.13</i>	CIMO 21MC049
Bactéria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas cf. kyugheensis</i>	CIMO 21MC001
Bactéria	Tenericutes	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma cf. insons</i>	CIMO 21MC002
Bactéria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus cf. warneri</i>	CIMO 21MC003

Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.2</i>	CIMO 21MC004
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Fron dih abitans sp.1</i>	CIMO 21MC006
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium cf. oceanosedimentum</i>	CIMO 21MC007
Bactéria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Hyphomicrobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium cf. mesophilicum</i>	CIMO 21MC009
Bactéria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas cf. aerolata</i>	CIMO 21MC010
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.7</i>	CIMO 21MC050
Bactéria	Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Priestia cf. megaterium</i>	CIMO 21MC051
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.1</i>	CIMO 21MC052
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas sp.3</i>	CIMO 21MC053
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas cf. rhizophila</i>	CIMO 21MC054
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas sp.4</i>	CIMO 21MC055
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas sp.2</i>	CIMO 21MC057
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas sp.1</i>	CIMO 21MC058
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Pseudoclavibacter cf. terrae</i>	CIMO 21MC059
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.9</i>	CIMO 21MC060
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium sp.1</i>	CIMO 21MC062
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium cf. herbarum</i>	CIMO 21MC063
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium sp.4</i>	CIMO 21MC065
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium sp.2</i>	CIMO 21MC067
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter sp.1</i>	CIMO 21MC068
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter sp.2</i>	CIMO 21MC070
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Okibacterium sp.1</i>	CIMO 21MC071
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.15</i>	CIMO 21MC072

Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.3</i>	CIMO 21MC073
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.8</i>	CIMO 21MC074
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter cf. humicola</i>	CIMO 21MC075
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium sp.3</i>	CIMO 21MC076
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.2</i>	CIMO 21MC077
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium cf. flaccumfaciens</i>	CIMO 21MC078
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium cf. foliorum</i>	CIMO 21MC079
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.6</i>	CIMO 21MC080
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.11</i>	CIMO 21MC081
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.5</i>	CIMO 21MC082
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.12</i>	CIMO 21MC083
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Corynebacteriales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus cf. fascians</i>	CIMO 21MC084
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium cf. phyllosphaerae</i>	CIMO 21MC085
Bactéria	Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Plantibacter sp.6</i>	CIMO 21MC086
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea sp.4</i>	CIMO 21MC088

**Tabela S 3.** Análise da similaridade (ANOSIM) baseada na distância de Bray-Curtis da composição bacteriana obtida pelo método de isolamento por maceração e explante, de nódulos (sintomático) e de caule sem sintomas (assintomático).

<b>Variáveis</b>		<b>R<sub>ANOSIM</sub></b>	<b>p</b>
<b>Assintomático vs Sintomático</b>	Total	0,099	0,011
	Macerado	0,227	0,005
	Explante	0,066	0,11