

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

## Mestrado em Olivicultura e Azeite

Dissertação

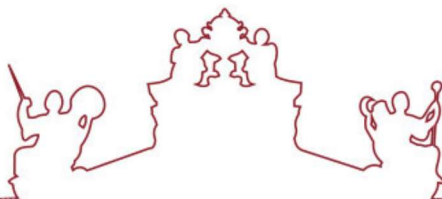
Estudo dos efeitos da suplementação em cálcio, na cultivar Galega vulgar, para proteção contra a antracnose da azeitona.

Luís Filipe das Neves Caeiro

Orientador(es) Maria Rosário Félix  
Ana Elisa de Mendonça Rato Barroso

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Olivicultura e Azeite

Dissertação

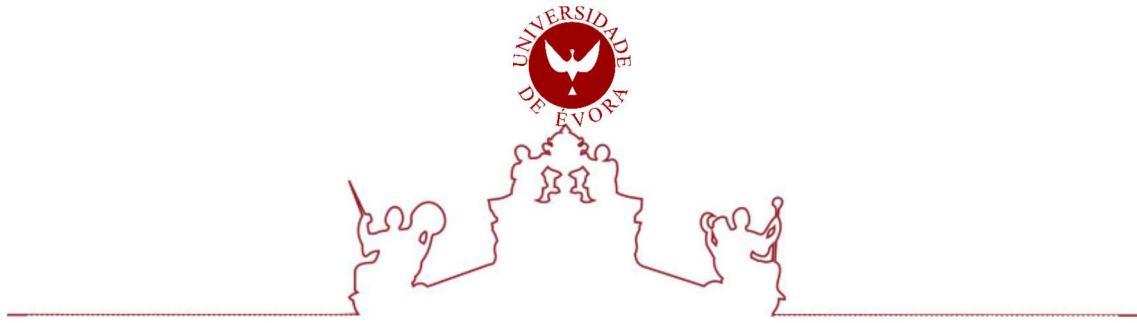
Estudo dos efeitos da suplementação em cálcio, na cultivar Galega vulgar, para proteção contra a antracnose da azeitona.

Luís Filipe das Neves Caeiro

Orientador(es) Maria Rosário Félix  
Ana Elisa de Mendonça Rato Barroso

Évora 2020





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente Augusto António Vieira Peixe (Universidade de Évora)
- Vogal Fernando Manuel de Campos Trindade Rei (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador Maria Rosário Félix (Universidade de Évora)

Dedicado à minha família  
e em memória dos meus avós

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras, a Professora Maria do Rosário Félix pela sua persistência e incentivo, na elaboração desta dissertação e à Professora Ana Elisa Rato pela sua pronta ajuda e disponibilidade nas dificuldades;

Ao Doutor Patrick Materatski e ao restante pessoal de laboratório, pela ajuda e disponibilidade que sempre disponibilizaram;

Ao amigo Augusto Ribeiro e à Rita, por tudo o que eles sabem;

À Eng<sup>a</sup> Elisabete Viegas, responsável comercial da NutriSapex Tradecorp Portugal, por ter acreditado no meu trabalho e financiado o “Calfinish” utilizado nas aplicações;

Aos meus pais, pela ajuda e apoio sempre presente;

Aos meus filhos pela paciência e compreensão, pelos atrasos e pelos dias que tive que dizer que não;

A todos os que não escrevendo o nome, são igualmente importantes e são tantos, por acreditarem em mim e me incentivarem a continuar.

## Publicações originais dos resultados referidos na tese

Caeiro, L.; Materatski, P.; Rato, A.; Varanda, C.; Campos, D.; Félix M. R.; Carvalho, T.; Vestia, J. (2019) “Suplementação em cálcio: Uma ajuda promissora na prevenção da antracnose da azeitona.”, 9ª Edição Investigar ICAAM- Évora (Março 2019).

Vestia, J.; Caeiro, L.; Cardoso, H; Félix, M.R.; Carvalho, T.; Rato, A.E. (2018) “ The fate of calcium applied through foliar fertilization on *Olea europaea L.*”, Olive Bioteq’18- Seville (Out. 2018).

Caeiro, L.; Materatski, P.; Rato, A.; Varanda, C.; Campos, D.; Vestia, J.; Rei, F.; Carvalho, T.; Félix, Maria R. (2018) “Suplementação em cálcio: Uma ajuda promissora na prevenção da gafa da azeitona.”, VIII Simpósio Nacional de Olivicultura- Santarém (Junho 2018).

Caeiro, L. (2018) “Qual a relação entre a aplicação de cálcio e a prevenção da gafa na azeitona?”. Revista “Voz do Campo” edição nº 217, Julho 2018.

Caeiro, L.; Félix, M. R. (2018) “Efeitos da suplementação em cálcio, na cultivar Galega vulgar, para proteção contra a antracnose da azeitona.”, Simpósio Olival, Nutrisapec/ Tradecorp Portugal- Beja (Março 2018).

## Resumo

A oliveira é cultivada desde a antiguidade com a finalidade de transformar os frutos em azeite ou conservá-los para o consumo em verde. Porém, esta cultura é afetada por diversas doenças e pragas que causam a degradação dos frutos, originando azeites com más características organoléticas e impossibilitando-os de se classificarem como azeites virgem extra ou virgem. Este trabalho pretende avaliar o efeito da aplicação foliar de cálcio no aumento da resistência epidérmica dos frutos, na cv. ‘Galega Vulgar’, de forma a atrasar e/ou evitar a contaminação pela antracnose causada pelos fungos do género *Colletotrichum*. As aplicações de cálcio, durante o período de desenvolvimento do mesocarpo e amadurecimento dos frutos promoveram o reforço das células da epiderme, sendo que a aplicação de 4 kg por hectare do produto utilizado foi a que melhores resultados nos apresentou, já que a sintomatologia apresentada ao fim de 15 dias após inoculação com o fungo foi apenas 20% em relação ao total da amostragem.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum* spp; Fertilização foliar; Cálcio; ‘Galega vulgar’

## **Study of the effects of calcium supplementation, in the cultivar 'Galega vulgar', to protect against olive anthracnose**

### **Abstract**

Olive trees are cultivated since ancient times in order to turn the fruits into olive oil or to conserve them for consumption in green. However, this crop is affected by various diseases that cause fruit degradation, causing oils with poor organoleptic characteristics and making them unable to classify as extra virgin or virgin olive oils. This work aims to evaluate the effect of calcium foliar application on increasing fruit epidermal resistance in cv. 'Galega Vulgar' to delay and / or prevent anthracnose contamination caused by fungi of the genus *Colletotrichum*. Calcium applications during mesocarp development and fruit ripening promoted the reinforcement of epidermis cells, where the application of 4 kg per hectare of the product used was the most promising since the symptoms presented after 15 days after of inoculation with the fungus was only 20% of the total sample.

**Keywords:** *Colletotrichum* spp.; Foliar fertilization; Calcium; 'Galega vulgar'



## Índice

Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Índice de Tabelas .....	7
Índice de Figuras .....	8
Lista de Abreviaturas/Acrónimos.....	9
1. Introdução.....	10
2. Objetivos .....	13
3. Revisão Bibliográfica .....	14
3.1 A cultura da oliveira .....	14
3.1.1 A origem e importância da oliveira .....	14
3.1.2 Taxonomia da planta e variedades mais utilizadas em Portugal.....	16
3.1.3 Necessidades edafo- climáticas da oliveira .....	17
3.1.4 Sistemas de condução.....	18
3.2 Principais doenças da oliveira .....	21
3.2.1 Vírus .....	21
3.2.2 Tuberculose ( <i>Pseudomonas savastanoi</i> p.v., <i>savastanoi</i> ).....	24
3.2.3 Síndrome do declínio súbito da oliveira ( <i>Xylella fastidiosa</i> ) .....	26
3.2.4 Olho-de-Pavão ( <i>Fusicladium oleagineum</i> Castagne) .....	27
3.2.5 Cercosporiose ( <i>Pseudocercospora cladosporioides</i> Sacc.).....	29
3.2.6 Verticiliose ( <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn) .....	32
3.2.7 Escudete ( <i>Camarosporium dalmaticum</i> (Thum) Zachos e Tzav-Klon).....	33
3.2.8 Antracnose ( <i>Colletotrichum</i> spp.) .....	35
3.3 Efeito da aplicação de cálcio na proteção dos frutos a doenças. ....	41
4. Materiais e Métodos .....	43
4.1 Localização do ensaio .....	43
4.2 Caracterização climática da zona .....	44
4.3 Tipo de solo .....	44
4.4 Descrição da parcela e itinerário cultural .....	45
4.5 Instalação e Condução do Ensaio .....	46
4.6 Colheita de amostras.....	47
4.7 Inoculação e incubação dos frutos.....	49

4.7.1 Observação das formas latentes .....	49
4.7.2 Inoculação e incubação dos frutos.....	49
4.8 Extração das paredes celulares .....	51
4.9 Análise do teor de cálcio presente nos frutos .....	52
4.10 Análise estatística dos dados experimentais.....	54
5. Resultados e Discussão .....	57
5.1 Detecção de formas latentes.....	58
5.2 Inoculação dos frutos provenientes dos vários tratamentos .....	59
5.3 Teores de cálcio presentes nas paredes.....	62
6. Conclusões.....	65
7. Estudos Futuros .....	67
8. Bibliografia.....	68

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Vírus detetados em oliveira e sua distribuição mundial.....	23
Tabela 2 - Relação entre temperatura e período incubação .....	40
Tabela 3 - Proporções relativas dos componentes das paredes celulares dos frutos, legumes e cereais.....	43
Tabela 4 - Datas das aplicações de cálcio.....	47
Tabela 5 - Datas de recolhas de amostras das diferentes fases.....	48
Tabela 6 - Resumo dos diferentes tratamentos realizados à amostra para posterior realização do AIR.....	52
Tabela 7 - Percentagem de Frutos Sintomáticos aos 8, 10, 15 e 20 dias após inoculação.....	60
Tabela 8 - Valores de teores de cálcio mg/g de AIR .....	64

## Índice de Figuras

Figura 1 - Expansão da oliveira na bacia do Mar Mediterrâneo.....	14
Figura 2 - Olival tradicional (10x10 m) variedade 'Galega'; Elvas.....	19
Figura 3- Olival Intensivo (3,5 x 7 m) variedade 'Picual; Torre de Figueiras.....	20
Figura 4 - Olival em Sebe (1,35 x 3,75 m) variedade 'Arbequina'; Olivais do Sul.....	21
Figura 5 - Tuberculose em raminho variedade 'Cobrançosa'; Monte do Corval.....	25
Figura 6 - <i>Xylella fastidiosa</i> ao microscópio de transmissão .....	26
Figura 7- Sintomas de <i>Fusicladium oleagineum</i> em folha; Herdade dos Lameirões.....	28
Figura 8 - <i>Fusicladium oleagineum</i> em fruto; Herdade dos Lameirões.....	29
Figura 9 - Cercosporiose em folha.....	30
Figura 10- Cercosporiose em fruto.....	31
Figura 11- Escudete.....	34
Figura 12- Fruto com Gafa.....	35
Figura 13 – Fases da infeção de <i>Colletotrichum</i> no fruto.....	36
Figura 14- Ciclo patogénico da Antracnose da oliveira causada por <i>Colletotrichum</i> spp. ....	38
Figura 15 - Localização da parcela de ensaios “Olival de St <sup>a</sup> Maria”.....	44
Figura 16- Carta de Capacidade de Uso de Solos.....	45
Figura 17 – Exemplo de fendas em solo franco-argiloso.....	46
Figura 18 – Esquema do ensaio .....	46
Figura 19 - Colheita de amostras no campo variedade 'Galega'; St <sup>a</sup> Maria.....	48
Figura 20 - Metodologia para Incubação e inoculação de <i>Colletotrichum</i> .....	51
Figura 21- Metodologia de análise ao cálcio presente na parede celular.....	54
Figura 22- Número de frutos sintomáticos ao <i>Colletotrichum</i> nas diferentes fases e tempos de observação periódica, com o respetivo erro padrão.....	55
Figura 23- Aspeto de transição de cores, fase 0 (A); 1 (B); 2 (C) e 3 (D). A - Fase 0; B - Início Maturação; C- Frutos Violáceos; D- Frutos Negros.....	58
Figura 24 - Teores de cálcio nas paredes celulares mg/g de parede celular.....	63

## Lista de Abreviaturas/Acrónimos

ATEVA: Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

AIR: Resíduo insolúvel em álcool (Paredes celulares)

°C: Graus Célsius

Ca<sup>2+</sup> : Cálcio (Ião)

CaCl<sub>2</sub> : Cloreto cálcio

dpi: Dias pós inoculação

GPP: Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral

HCl: Ácido clorídrico

HNO<sub>3</sub>: Ácido nítrico

H<sub>2</sub>O: Água

INE: Instituto Nacional de Estatística

N: Moles/ Litro

NaCl: Cloreto sódio

NE: Nordeste

NW: Noroeste

PG: Poligalacturonas

Ψ: Potencial hídrico

## 1. Introdução

A oliveira é cultivada desde a antiguidade com a finalidade de transformar os seus frutos em azeite, ou conservá-los, para consumo em verde. As conservas de azeitona permitem manter os frutos em condições de consumo durante longo período de tempo possibilitando o consumo humano, após lhe ser retirada a “oleuropeína” através de várias lavagens e adicionar-lhe sal.

O azeite é rico em compostos fenólicos, sendo estes responsáveis não só pelo sabor e estabilidade, mas também pela sua capacidade anti doenças, os compostos fenólicos são anti-oxidantes, contribuindo para um reforço do organismo contra doenças cardiovasculares e cancerígenas (Conde *et al.*, 2008). É por isso mesmo considerado um dos elementos principais da dieta mediterrânica.

No que diz respeito a doenças do olival, uma das mais importantes em todo o mundo olivícola é a “antracnose” da azeitona. Esta doença causa grandes prejuízos, pois provoca a queda de frutos e potencia a sua rápida degradação originando uma perda de qualidade dos frutos que chegam ao lagar, contribuindo para uma rápida oxidação dos azeites provenientes destes frutos contaminados. Foram identificados associados à doença várias espécies de fungos pertencentes ao género *Colletotrichum* e agrupados nos complexos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* (Mosca *et al.*, 2014; Talhinhos *et al.*, 2015).

Em Portugal o complexo predominante é o *acutatum*, cerca de 97% (Talhinhos *et al.*, 2010). Sendo que uma das espécies pertencentes a este complexo, é o *Colletotrichum nymphae*, com grande representatividade no Alentejo (Materatski *et al.*, 2018).

Os frutos infetados que permanecem no campo são as principais fontes de inóculo da doença e fonte de contaminação para o ano seguinte. A gravidade da doença varia com as condições ambientais, grau de suscetibilidade da cultivar e com a virulência do agente patogénico. A suscetibilidade dos frutos à doença aumenta com o avanço da maturação e com condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, temperatura média de 22°C e humidade relativa superior a 90% (Caciola *et al.*, 2012).

Os custos no controle da doença, só em Espanha, o maior produtor mundial de azeitona, chegaram aos 200 milhões de euros em 2007 (Trapero *et al.*, 2009).

A degradação das paredes celulares do fruto, sendo um processo bioquímico, para a maioria das espécies, dá-se independentemente da colheita. Pelo contrário a perda de água só contribui para a diminuição da firmeza do fruto na pós-colheita (Rato A., 2009).

O processo de maturação normal tem como consequência a diminuição da firmeza dos frutos, ficando este processo a dever-se fundamentalmente a dois fenómenos; a diminuição da pressão de turgescência das células ( $\Psi$ ) devido à perda de água, após colheita e à degradação das paredes celulares. Este último é o fator que mais contribui para as alterações da textura dos frutos (Tucker, 1993).

A degradação e fragilidade da parede celular são dos principais motivos pela maior ou menor facilidade de entrada de agentes patogénicos para o interior do fruto (Agrios, 1998). Aliada à degradação da parede celular, os frutos da cv. 'Galega vulgar' apresentam uma camada epidérmica muito fina, sendo esta variedade, muito suscetível à antracnose também devido à sua altura de maturação coincidir com a altura de maior atividade do fungo (Materatski *et al*, 2018).

Na parede celular existem vários tipos de ligações entre os polímeros que constituem a parede. As microfibrilhas de celulose estabelecem ligações entre si, por pontes de hidrogénio, tal como se verifica entre as microfibrilhas e as hemiceluloses. Os polissacarídeos da lamela média têm a particularidade de se conseguirem associar por intermédio de catiões, como o cálcio. Os iões  $\text{Ca}^{2+}$ , na lamela média, vão ligar-se aos grupos carboxilo não esterificados do ácido galacturónico, formando "cross-linking bridges", ou ligações por pontes de cálcio, sendo a estrutura formada conhecida por "egg-box" ou "caixa de ovos". Desta forma ficam ligadas de forma não covalente, duas cadeias antiparalelas adjacentes. Embora a ligação por pontes de cálcio não seja das mais resistentes, vão tornar as paredes celulares estruturas mais sólidas (Tucker, 1993).

A deficiência em cálcio, nos frutos, pode pois ser responsável por uma debilidade na epiderme, o que torna esta estrutura mais suscetível à ação dos fungos e de pragas, permitindo a sua entrada e posterior contaminação dos frutos, assim como a probabilidade de ocorrência de acidentes fisiológicos em frutos estruturalmente menos estáveis, aumenta. Quando esta deficiência acontece no período de crescimento e divisão celular, manifesta-se durante a colheita, armazenamento e comercialização. São atribuídos à deficiência em cálcio, problemas como o bitter pit, a "rachadura" dos frutos, a degenerescência interna e a depressão lenticelar. O cálcio é constituinte indispensável da parede celular (Poovaiah, 1988) e proporciona estabilidade e permeabilidade seletiva às membranas celulares (Marschner, 1995). Altos teores de cálcio nos frutos tendem a retardar o processo de maturação e senescência, devido à diminuição da síntese de etileno e a atividade respiratória durante o armazenamento (Poovaiah, 1986). Mesmo que o teor de cálcio no solo seja ótimo, pode existir deficiência na planta e no fruto. Isto deve-se à baixa translocação do cálcio via floema, sendo o fruto suprido somente na fase inicial de

desenvolvimento, por via xilémica. Além disso, os pontos de crescimento da planta competem simultaneamente com os frutos por este nutriente (Natale *et al.*, 2005).

Algumas práticas culturais de suplementação em cálcio podem evitar perdas por desordens fisiológica, assim como retardar a senescência dos frutos. Recomenda-se a aplicação de calcário antes da implantação do pomar e durante a sua vida útil. (Brackmann e Ribeiro, 1992). Segundo Iuchi *et al.* (2001) recomendam no mínimo cinco aplicações pré-colheita de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), na concentração de 0,6%, a cada 15 dias, sendo iniciados aproximadamente 30 dias após a plena floração. Além disso, aplicações pós- colheita de  $\text{CaCl}_2$  a 0,2% mantêm alta acidez titulável (Brackmann *et al.*, 1994) e a firmeza de polpa e reduzem a incidência de podridões durante o armazenamento (Brackmann *et al.*, 1996).



## 2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste em estudar os efeitos da aplicação de cálcio via foliar, como potenciador da resistência da parede celular das células da epiderme, de modo a formar uma “barreira” física à entrada dos fungos do género *Colletotrichum* causador da antracnose da oliveira. Pretende-se avaliar a capacidade de penetração do fungo no fruto, e o aparecimento das lesões indicadoras de infeção após aplicações de cálcio via foliar aos frutos, em duas doses diferentes.

Pretende-se ainda avaliar a deposição de cálcio através de espectrofotometria de absorção atómica, comprovando os teores de cálcio presente nas células da parede celular, das diferentes modalidades utilizadas no ensaio de campo.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1 A cultura da oliveira

##### 3.1.1 A origem e importância da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.), na sua forma mais primitiva, remonta à Era Terciária e segundo a opinião de vários autores, situa-se na Ásia Menor, sendo provavelmente na Palestina ou na Síria. Segundo Civantos (2007) a oliveira é originária da região geográfica que ocupa desde o Sul do Cáucaso até aos planaltos do Irão, Palestina e a zona costeira da Síria, estendeu-se pelo Chipre até a Anatólia, e por Creta até ao Egito, acabando por povoar todos os países da Bacia Mediterrânea.

Segundo Gouveia (2000) A domesticação da oliveira começa nas épocas paleolítica e neolítica, ou seja, 10000 a 3000 a.C., possivelmente na antiga Mesopotâmia de onde passou para o Egito (2000 a.C.) e depois às ilhas, Ásia Menor, Palestina e Grécia continental (1800 a.C.). Sabe-se que tanto os fenícios como os sírios e os arménios a conheciam, a cultivaram e a disseminaram por todo o Mediterrâneo Oriental, três mil anos antes do nascimento de Cristo.

No mapa da figura 1 observa-se a difusão da oliveira pela bacia do Mediterrâneo.

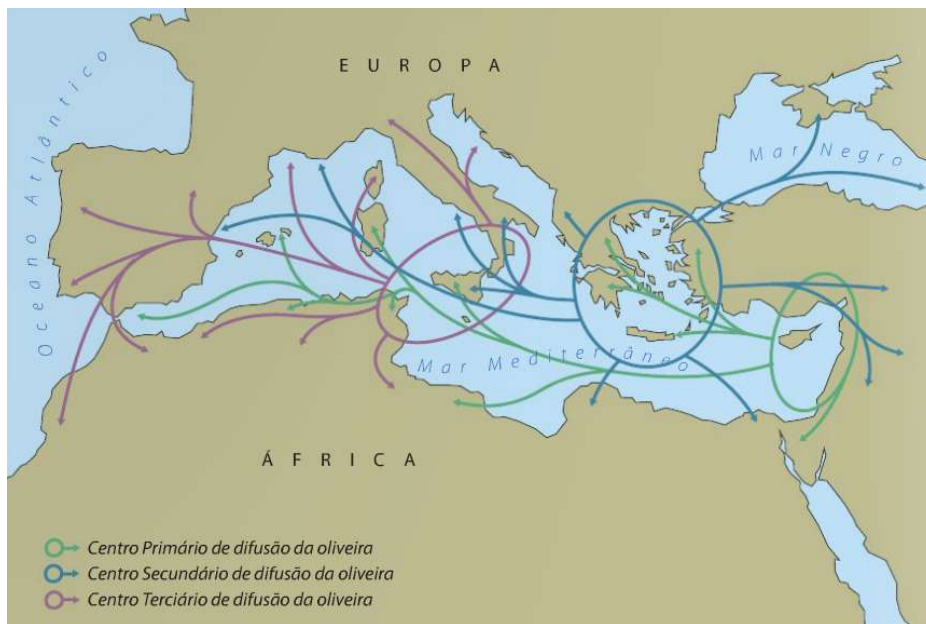


Figura 1 - Expansão da oliveira na bacia do Mar Mediterrânico (Fonte: Bohm, 2013).

A importância do azeite na bacia Mediterrânea, aparece, não só como um produto alimentar, mas também como um produto combustível utilizado na iluminação (azeite lampante) ou como um produto utilizado em rituais de adoração, fazendo parte das oferendas a muitos altares, para além da transformação em azeite, a azeitona é consumida em verde, após o processo de conserva, atingindo o seu consumo na bacia do Mediterrâneo, valores consideráveis.

Na conserva do fruto em verde, para consumo posterior, há características a manter ou a controlar, como a amargura, cor, dureza, crocância, fibrosidade ou a salinidade, esta última com importância especial devido a uma maior preocupação com problemas cardiovasculares por parte do Homem. Numa tentativa de diminuir a concentração de sal nas conservas, por outro conservante, foram realizados estudos em que o NaCl, foi substituído em parte por CaCl<sub>2</sub>, quanto maior a proporção de CaCl<sub>2</sub> menor foi a percepção de salinidade, melhor a cor, mas maior amargura, dureza, fibrosidade e crocância. Tal como na aplicação foliar e em frutos, para transformação em azeite, o cálcio, na formulação CaCl<sub>2</sub>, mostra que aumenta a conservação dos frutos, através de um aumento de resistência da epiderme, aumentando em azeitonas de conserva, parâmetros como a crocância e dureza (López- López *et al.*, 2016).

O azeite é hoje reconhecido como um produto benéfico à saúde, devido à sua constituição em ácidos gordos polinsaturados. O ácido oleico também é conhecido como ômega-9, sendo uma gordura monoinsaturada é menos suscetível à deterioração do que outras gorduras. Pode fazer parte da composição do azeite até 85%. Estudos apontam vários benefícios para a saúde ligados ao consumo de azeite, entre eles estão a diminuição das lipoproteínas de baixa densidade nocivas (LDLs) na corrente sanguínea, e o aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade benéficas (HDLs) (Lor *et al.*, 2003). O ácido linoleico, também é conhecido como ômega-6, é uma gordura do tipo poliinsaturada. A substituição dos ácidos gordos saturados (encontrados principalmente em gordura vegetal) por ácidos gordos polinsaturados reduz o colesterol LDL do sangue. Os ácidos gordos polinsaturados possuem no entanto o inconveniente de diminuir o colesterol HDL quando utilizados em grande quantidade. Algumas pesquisas apontam ainda, que níveis excessivos de ácidos gordos ômega-6 podem aumentar a probabilidade de ocorrência de algumas doenças, sendo necessário um equilíbrio entre os dois para se beneficiar das funções (Lor *et al.*, 2003).

Embora os países mediterrâneos com maior tradição na cultura da oliveira sejam a Grécia e a Itália, hoje cada um destes produz menos de 10% da produção mundial, com especial referência para a Itália que tem vindo nos últimos tempos a ver uma diminuição considerável na sua área produtiva (Bohm, 2013). A Itália para além da diminuição de produção principalmente devida à não renovação dos seus olivais, conta atualmente com um foco da bactéria *Xylella fastidiosa*, o que

obriga ao abate das árvores infetadas, já que esta patologia, de momento não tem cura levando as plantas à morte. Atualmente a Península Ibérica produz cerca de 60% da produção mundial, demonstrando bem o avanço e melhoramento que a cultura tem vindo a receber (COI, 2016).

Segundo os dados da “Estatísticas Agrícolas 2012” nesse ano existia uma área de olival em Portugal de 338 562ha, sendo que desta área 174 000ha se encontravam no Alentejo, onde se obteve uma produção de 404 626 toneladas de azeitona (INE, 2013). Os mesmos dados relativos a 2016, mostram que a área de olival nacional aumentou entretanto para 347 093ha, pertencendo a esta área 180 607ha localizados no Alentejo, cerca de 52% da área nacional, tendo no mesmo ano obtido nesta região uma produção de 348 935 toneladas, cerca de 73% da produção nacional (INE, 2017).

### 3.1.2 Taxonomia da planta e variedades mais utilizadas em Portugal

Planta de folha perene, dicotiledónea da classe *Magnoliopsida* pertencente à Ordem *Scrophulariales*, família *Oleaceae*, subfamília *Oleoideae*, género *Olea*, espécie *Olea europaea* L. (Therios, 2009), desta família existem cerca de 29 géneros, destacando-se o género *Olea* (Heywood, 1987, citado por Rapoport, 2008).

Entre as 35 espécies do género *Olea* encontramos a *Olea europaea* L. esta espécie tem 2 sub-espécies a *Olea europaea sativa* (oliveira cultivada) e a *Olea europaea sylvestris* (forma selvagem, conhecida como zambujeiro) (Bohm, 2013).

A oliveira cultivada origina plantas de porte médio com 4 a 8 metros de altura, possuindo grande longevidade (existem plantas com mais de 2000 anos), copa densa, sistema radicular profundo (Bohm, 2013).

A produção de frutos dá-se nos ramos de um ano que se desenvolveram durante o ano anterior, sendo nos meses de Junho e Julho que ocorrem os maiores crescimentos. As folhas são de forma simples, inteiras, geralmente lanceoladas de pecíolo curto, apresentando coloração diferente na página superior e inferior (Garcia, 2005).

As flores agrupam-se em inflorescências, do tipo panícula, estas desenvolvem-se nas axilas das folhas dos nós dos ramos do ano anterior. As inflorescências apresentam flores perfeitas

(hermafroditas) e estaminíferas (masculinas) podendo a proporção entre as duas ser variável. As flores são compostas por dois estames, com antera grossa; pistilo com ovário com 4 óvulos, dos quais só um será fecundado, dando origem à semente (caroço); estilete e estigma com dois lóbulos.

Em Portugal estão descritas 22 variedades de oliveira (Leitão *et al.*, 1986) sendo que até ao final dos anos 90 do século passado, perto de 80% do olival nacional era composto por árvores da cultivar 'Galega vulgar'.

A cultivar 'Galega vulgar', segundo a região onde se encontra, é também conhecida por, 'Galega', 'Galega miúda', 'Molarinha', 'Molar', 'Negrucha' ou 'Negroa'. Podemos encontrá-la em quase todo o país, particularmente na Beira Interior, Ribatejo e Alentejo (Navero *et al.* 2000).

Algumas das restantes cultivares utilizadas nos olivais tradicionais e alguns olivais em modo de produção intensivos, são as seguintes:

'Cobrançosa'; 'Picual'; 'Carrasquenha'; 'Verdeal'; 'Cornicabra'; 'Maçanilha de Tavira'; 'Azeiteira'; 'Cordovil'; 'Bical' e 'Blanqueta' (Leitão *et al.*, 1986).

Quanto aos novos olivais, plantados na última década, as cultivares mais utilizadas tanto em plantações intensivas como em super-intensiva ou sebe, são as seguintes:

'Arbequina'; 'Arbosana'; 'Cobrançosa'; 'Sikitita'; 'Koroneiki'; 'Oleana'; 'Frantoio'; 'Picual' e 'Tosca'.

### 3.1.3 Necessidades edafo- climáticas da oliveira

Apesar de lhe ser atribuída elevada rusticidade a oliveira necessita de um pH superior a 6.0 e inferior a 8.5 e solos bem drenados, pois é sensível ao encharcamento (Rodrigues, 2014).

Suporta temperaturas entre os -10°C e os 45°C, estando presente nas regiões com médias entre 22°C e 30°C no mês mais quente, não devendo a média do mês mais frio ser inferior a 4°C. A temperatura durante a floração deverá rondar os 21-22°C, sendo que a partir dos 30°C se verificam quebras de produção. Necessita de uma média de 400 a 700 horas de frio abaixo de 7,2°C para que ocorra diferenciação floral. Temperaturas muito altas durante a maturação provocam redução do teor de ácido oleico, aumentando o ácido linoleico, sendo de todo indesejável, (Rodrigues, 2014).

A precipitação ideal situa-se entre os 800 a 1000mm, para os olivais de sequeiro, sendo que o mínimo aceitável são 400mm anuais, para que se tenha uma produção economicamente viável (Garcia, 2005).

No entanto para atingir produções viáveis em regadio, tanto em olivais intensivos, como em super-intensivos (7000Kg a 20000Kg) são necessárias dotações na ordem dos 3500m<sup>3</sup>/ha (Todolivo, 2010).

### **3.1.4 Sistemas de condução**

A constante procura no aumento da eficiência e da produção, fez com que o homem, na história da produção olivícola organiza-se o cultivo da espécie, passando de plantas dispersas, para olivais com compassos de 10x10m (entre- linha x linha) ou até mesmo 10x8m, onde o espaço entre plantas era muitas vezes utilizado para consociações com o cultivo da oliveira, como é o caso da vinha, alfarrobeiras, figueiras, ou culturas temporárias de sequeiro como a cevada, centeio ou aveia. O aparecimento do regadio trouxe o cultivo intensivo com compassos de 7x5m (mais usual) ou 6x6m, aumentando consideravelmente a produção. Por fim surgiu o olival em sistema super-intensivo em que se podem observar compassos de 1,5x6m até 1,0x3,75m.

#### **3.1.4.1 Sistema de condução tradicional**

O sistema de condução tradicional (figura 2) possui compassos de plantação com grandes espaçamentos entre árvores como 10x10m ou 10x8m, conseguindo-se densidades de 100 e 125 plantas/ha respetivamente. Tais compassos tinham como justificação uma maior área de solo para cada oliveira, uma vez que estas eram exploradas em regime de sequeiro, formando-se árvores de grande copa, permitindo a obtenção de produções elevadas por árvore, embora baixas por hectare (Cordeiro, 2014). Este sistema permitia ainda uma consociação do olival com outras culturas, a produção iniciava-se apenas vários anos após a plantação, uma vez que os clones utilizados não eram tão precoces como os atuais. No que diz respeito às produções estas situam-se entre 1000 a 1800kg/ha (Cordeiro, 2014).



**Figura 2 - Olival tradicional (10x10 m) cultivar 'Galega'; Elvas.**

Para além do sistema com compassos ordenados, como o da figura 2, é possível encontrar olivais tradicionais sem ordenação, tais olivais são formados por plantas dispersas sem distâncias certas entre elas, muitas vezes tal é devido a estes olivais ocuparem áreas de montes e serras, ou de solos com grande número de afloramentos rochosos.

### **3.1.4.2 Sistema de condução Intensivo**

O sistema de condução intensivo (figura 3) surge aliado a um maior conhecimento agronómico da cultura, assim como de um aumento do potencial produtivo através da seleção varietal, garantindo a homogeneidade das plantações e das suas produções, permitindo a aproximação de plantas com um aproveitamento homogénio de espaço. Conjuntamente com novas técnicas de fertilização e irrigação, onde passou a ser usado o sistema de rega localizada (García, 2003).

Este sistema veio permitir a mecanização da cultura, principalmente a colheita, diminuindo os custos de produção e aumentando a produção por hectare, com o aumento da densidade até cerca das 300 plantas/ha. Neste sistema, o olival inicia a produção ao 3º ano após a plantação, podendo atingir produções entre 8.500 a 10.000 kg/ha (Bohm, 2013).





**Figura 3 - Olival Intensivo (3,5x7 m) cultivar 'Picual'; Torre de Figueiras- Monforte.**

Este sistema inclui nos seus compassos distâncias entre 5x7m, com uma densidade de 285 plantas por ha; 5x6m, com uma densidade de 333 plantas por ha; ou a apresentada na figura 3, de 3,5x7m também designada por “alta densidade” conseguindo-se ter uma densidade de plantas de 406 plantas por ha. Este último compasso, não permite a utilização de vibradores de tronco com panos invertidos de receção, devido à curta distância entre plantas, na linha.

#### **3.1.4.3 Sistema de condução super-intensivo**

No final do séc. XX surge em Espanha um novo sistema de condução, o super-intensivo ou olival em sebe (figura 4), caracterizado por um aumento de densidade (1200 a 2000 plantas/ha). Este novo método permite a total mecanização da cultura incluindo a colheita e as podas (Todolivo, 2010).





**Figura 4 - Olival em Sebe (1,35 x 3,75 m) variedade 'Arbequina'; Olivais do Sul.**

É o sistema de produção com investimento inicial mais elevado. No entanto, é o que permite produções mais elevadas assim como um retorno do investimento mais rápido, embora os custos com a fertilização continuem a ser os mais elevados dos três sistemas. Permite um aumento de eficiência e de racionalização de recursos, reduzindo os custos e aumentando ao longo dos anos a rentabilidade da cultura. Neste sistema, o olival inicia também a produção ao 3º ano após plantação, podendo atingir produções de 15.000 a 20.000 Kg/ha (Todolivo, 2010).

No sistema em sebe, ou super-intensivo os compassos variam entre 1,35x3,75m (figura 4) com uma densidade de plantas por ha de 1970; 1,5x4m, com uma densidade por ha de 1665 plantas, até aos compassos de 1,5x6m utilizados num sistema recentemente utilizado de sequeiro ajudado, atingindo uma densidade de 1105 plantas por ha.

## **3.2 Principais doenças da oliveira**

### **3.2.1 Vírus**

Os vírus são conhecidos como agentes causadores de doenças, podendo genericamente ser definidos como nucleoproteínas, sendo nalguns casos complexadas com hidratos de carbono e lípidos, submicroscópicas, com capacidade de infeção exclusiva a células vivas, possuindo

capacidade de causar doença. Só os criptovírus são exceção a esta última característica (Cardoso *et al.*, 2005).

A investigação relativamente ao campo da virologia sofreu um incremento a partir de 1977, em Itália, na cv. 'Corregiolo', tendo recorrendo-se ao uso do microscópio eletrónico (Paccini e Cresti, 1977). Dessa data até à atualidade os estudos em virologia têm vindo a ser desenvolvidos principalmente em Itália, Portugal e Espanha, existindo nalguns casos a colaboração de investigadores do Médio Oriente e Norte de África.

Até agora estão identificados 15 vírus em oliveira, acreditando-se que este número irá aumentar, à medida que os estudos avançarem. Destes 15, foram detetados 8 em Portugal (Henriques *et al.*, 1990; Henriques, 1994; Félix *et al.*, 2002), sendo que um deles está referenciado apenas em Portugal (Cardoso *et al.*, 2005) (tabela 1).

Tabela 1- Vírus detetados em oliveira e sua distribuição mundial (adaptado de Grieco *et al.*, 2000; Fadel *et al.*, 2005 Cardoso *et al.*, 2005).

	Vírus	Género	Distribuição geográfica
1	<i>Strawberry latent ring spot</i> (SLRSV)	<i>Sadwavirus</i>	Itália, Portugal, Espanha, Egipto, EUA, Líbano, Síria
2	<i>Arabis mosaic</i> (ArMV)	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal, Egipto, EUA, Líbano, Síria
3	<i>Cherry leaf roll</i> (CLRV)	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal, Espanha, Egipto, USA, Líbano, Síria
4	<i>Olive latent ring spot</i> (OLRSV)	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal, Espanha, Egipto, Líbano, Síria
5	<i>Cucumber mosaic</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	Itália, Portugal, Síria
6	<i>Olive latent 1</i> (OLV-1)	<i>Necrovirus</i>	Itália, Portugal; Espanha, Síria
7	<i>Olive latent 2</i> (OLV-2)	<i>Oleavirus</i>	Itália, Jordânia, Turquia, Japão,
8	<i>Olive vein yellowing associated</i> (OVYaV)	<i>Potexvirus</i>	Portugal, Líbano, Síria
9	<i>Olive yellow mottling and decline associated</i> (OYMDaV)	Não atribuído	Itália, Líbano, Síria
10		<i>Tobamovirus</i>	Itália
11	<i>Tobacco mosaic</i> (TMV)	Não atribuído	Itália
12	<i>Olive semilatifolia</i> (OSLV)	<i>Closterovirus</i>	Itália
13	<i>Olive leaf yellowing associated</i> (OLYaV)	<i>Necrovirus</i>	Itália
14	<i>Tobacco necrosis D</i> (TNV-D)	<i>Necrovirus</i>	Itália
15	Olive mild mosaic virus (OMMV)	<i>Marafivirus</i>	Itália, Líbano, Israel, Egipto, EUA, Síria
	Olive latent virus 3 (OLV-3)		Portugal
			Portugal, Turquia, Síria, Malta, Líbano, Grécia, Tunísia, Itália

- Sintomatologia

Atualmente, ainda não é possível estabelecer uma relação clara entre a presença de sintomas e um vírus causal específico. Essas dificuldades são de várias ordens, por exemplo, a ausência de indicadores lenhosos específicos, conseguir-se uma técnica de inoculação com garantia de penetração eficaz do vírus nos tecidos da oliveira, ou a falta de conhecimento da duração do período de incubação (Félix e Clara, 2007).

- Meios de Proteção

A prevenção é o único meio de proteção contra os vírus, utilizando-se material vegetal selecionado e certificado (Félix e Clara, 2007).

### 3.2.2 Tuberculose (*Pseudomona savastanoi* p.v., *savastanoi*)

Esta doença é causada por uma bactéria com metabolismo aeróbio, que entra na planta através de feridas abertas na epiderme, ou pelos estomas. Pode ser dispersada pela chuva, vento ou pelo homem, através de técnicas culturais (Marchi *et al.*, 2005b).

São condições favoráveis ao seu desenvolvimento, temperaturas entre 4 e 38°C, com um valor ótimo entre os 23 e 24°C. É visualmente identificada por apresentar pequenas galhas, resultantes de fenômenos de hipertrofia e hiperplasia na sequência da atividade de estirpes virulentas, possuindo estas num plasmídeo, genes capazes de sintetizarem auxinas, particularmente IAA (ácido indolacético) e citoquininas responsáveis pela multiplicação desregulada de células infetadas, formando os tumores (Peñalver *et al.*, 1988; Young, 2004; Agrios, 2005).

- Sintomatologia

A sintomatologia mais característica, é a formação de galhas (figura 5), tornando a sua identificação fácil. Estes desenvolvem-se sobretudo nos gomos, ramos jovens e tronco, no entanto podem observar-se em qualquer órgão da planta. Raramente aparecem nas folhas, quando acontece, estas apresentam cloroses e necroses, acabando a folha por cair. As galhas apresentam forma arredondada, inicialmente de tamanho pequeno, de cor esverdeada ou castanha-clara e superfície lisa, no entanto à medida que vão crescendo, vão apresentando superfície irregular, com fissuras e consistência lenhosa. Nestas fissuras, é frequente algumas pragas realizarem as suas posturas, como é o caso da *Euzofera pinguins*. Algumas vezes pode ocorrer a morte dos ramos, causada pela desorganização dos feixes vasculares ocasionados pelo crescimento anormal das células que depois vão formar a galha (Young, 2004).

- Etiologia e epidemiologia

A bactéria introduz-se nos tecidos, através de feridas provocadas pela colheita, podas, geadas, granizo, ou por feridas provocadas por ataques de mosca, caruncho ou outros insetos (Cantero, 1997; Trapero e Blanco, 2004). Por ter capacidade de infecção sistémica, pode infetar plantas jovens, não apresentando sintomatologia (Schroth, 2002).



**Figura 5 - Tuberculose em raminho variedade 'Cobrançosa'; Monte do Corval- Reguengos de Monsaraz.**

- Meios de Proteção

Não existem substâncias ativas homologadas para o combate a esta doença. Os mais utilizados são produtos à base de cobre, no entanto há países em que o uso de antibióticos é possível, estes, são aplicados através de pulverização (Trapero e Blanco, 2004; Young, 2004). O cobre não sendo uma substância antibiótica tem no entanto efeitos sobre a bactéria como bacteriostático, evitando a sua multiplicação e evitando assim novas infeções.

Em olivais bastante afetados é recomendada a aplicação de cobre durante o Outono e Primavera, antes que ocorram chuvas, uma vez que estas eliminam o cobre aplicado. Particularmente, deve ser usado após podas, ocorrência de geadas tardias e granizos, assim como quando o risco de infecção é elevado (Peñalver *et al.*, 1998).

### 3.2.3 Síndrome do declínio súbito da oliveira (*Xylella fastidiosa*)

Esta doença é causada por uma bactéria Gram- negativa, que coloniza os vasos xilémicos, obstruindo a passagem de água e nutrientes. Pode atacar variadas espécies de plantas, mais de 150 e possui associado como vetor de propagação o inseto *Philaenus spumarius*, conhecido vulgarmente como “Cigarrinha da espuma” (Pereira, 2014). A sua temperatura óptima de desenvolvimento situa-se entre os 26 e os 28°C, sendo que fora deste intervalo apresenta um crescimento muito lento.

Esta bactéria divide-se em 3 subespécies: *Xylella fastidiosa fastidiosa*, *Xylella fastidiosa multiplex* e *Xylella fastidiosa pauca*, sendo que cada subespécie tem preferências em relação ao hospedeiro (Cariddi *et al.*, 2014).

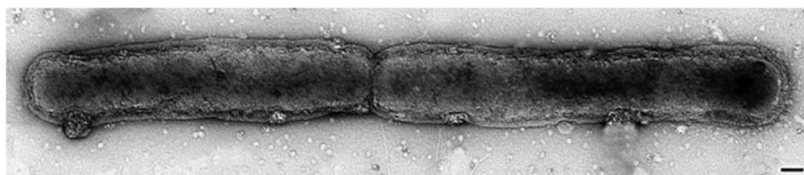


Figura 6 - *Xylella fastidiosa* ao microscópio de transmissão (Saponari *et al.*, 2014).

Carateriza-se por aparecimento de murchidão e morte dos rebentos terminais, necrose da zona apical das folhas e morte rápida dos rebentos levando em casos extremos à morte da árvore. Normalmente os sintomas ocorrem em árvores mais velhas (DGAV, 2018).

- Sintomatologia

Aparecem queimaduras foliares, seguindo-se um declínio rápido, principalmente visível em oliveiras envelhecidas, com morte progressiva da zona apical, para a raíz (Pereira, 2014).

- Etiologia e epidemiologia

As células bacterianas (figura 6), após inoculadas pelo vetor, deslocam-se no xilema aderindo às paredes dos vasos, onde se multiplicam, produzindo exopolissacáridos, formando um biofilme de colónias, que pode obstruir completamente os vasos do xilema, impossibilitando o transporte de água e nutrientes (Pereira, 2014).



- Meios de Proteção

Não existindo meios diretos de luta contra as doenças causadas por *Xylella fastidiosa*, a proteção passa por medidas preventivas, de forma a impedir a sua introdução e propagação. As novas plantações deverão utilizar plantas sãs, provenientes de viveiros autorizados pelos Serviços Oficiais. No caso de plantas atacadas, para além da declaração obrigatória, é necessário arrancar e queimar as plantas atacadas e combater os insetos vetores (Pereira, 2014)

### 3.2.4 Olho-de-Pavão (*Fusicladium oleagineum* Castagne)

*Fusicladium oleagineum* é um fungo imperfeito constituído por conídeos unicelulares ou bicelulares, que se formam na extremidade de conidióforos. Segundo López- Villalta (1999) é a doença mais comum do olival. Observando-se maior incidência em anos chuvosos, zonas húmidas e conduções que dificultem o arejamento.

- Sintomatologia

Podem observar-se lesões no limbo, e também no pecíolo da folha, no pedúnculo e epicarpo do fruto (Trapero e Blanco, 2004). Os sintomas nas folhas caracterizam-se por lesões circulares, na página superior lembrando os falsos “olhos” nas caudas dos pavões (figura 7), de onde deriva o nome vulgar da doença, podendo estas lesões passar a necroses (Trapero *et al.*, 1998). No entanto, é possível também haver ataques ao pedúnculo dos frutos, provocando a sua queda. Possui capacidade de hibernação sob a forma de micélio, nas folhas e/ou frutos que se encontram na árvore, ou no chão.

Em infeções ocorridas no pecíolo foliar, surgem pequenas necroses, que vão aumentando de tamanho, originando a queda da folha (Cantero, 1997; Trapero e Blanco, 2004).

Os principais prejuízos estão relacionados, com queda abundante de folhas, quando se registam ataques muito severos, com a consequente perda de vigor da árvore, devido à diminuição de fotoassimilados e diminuição da produção, pode também provocar queda prematura de frutos (figura 8) na maioria das vezes com o pedúnculo agarrado.

- Etiologia e epidemiologia

O micélio de *Fusicladium oleagineum* desenvolve-se na camada subepidérmica dos tecidos infetados, nessa zona encontra as condições de desenvolvimento e esporulação e proteção contra

as radiações solares e desidratação (Trapero e Blanco, 2004). Do micélio emergem para o exterior os conidióforos (Cantero, 1997; Trapero e Blanco, 2004).

Por ação das chuvas os conídios vão separar-se dos conidióforos, ocorrendo a dispersão a curtas distâncias e geralmente em sentido descendente, na oliveira, preferindo as folhas mais jovens (Trapero e Blanco, 2004). A germinação dos conídios assim como a formação do tubo germinativo dá-se entre os 0 e 27°C de temperatura, tendo como valor ótimo de desenvolvimento próximo dos 15°C (Trapero e Blanco, 2004). A ocorrência destes valores dá-se no início da Primavera e final do Verão, sendo os dois períodos mais favoráveis à ocorrência de infecção. Para que os conídios germinem é necessário a presença de água, quer provenha de chuva, ou de condensação do vapor de água (Cantero, 1997).



**Figura 7- Sintomas de *Fusicladium oleagineum* em folha;  
Herdade dos Lameirões- Safara.**





**Figura 8 - *Fusicladium oleagineum* em fruto;  
Herdade dos Lameirões- Safara.**

- Meios de Proteção

Os meios de proteção para esta doença, são químicos, sendo que atualmente, para além do cobre, existem produtos sistêmicos. Enquanto os fungicidas cúpricos atuam preventivamente e por contato, inibindo a germinação dos esporos do fungo, os sistêmicos, conseguem eliminar o fungo já no interior da planta. Os principais cuidados a ter prendem-se com a altura da aplicação, não devendo os fungicidas de contato serem aplicados, se se prevê chuva nos próximos dias, uma vez que não apresentam capacidade de penetração sendo por isso facilmente arrastados pela água (Trapero, s/ d; Cantero, 1997; Trapero e Blanco, 2004).

### **3.2.5 Cercosporiose (*Pseudocercospora cladosporioides* Sacc.)**

Esta doença é causada pelo fungo *Pseudocercospora cladosporioides*. Ataca sobretudo as folhas, com conseqüente desfoliação, com as conseqüências negativas no desenvolvimento e produção da planta (Vossen, 2004). Os ataques aos frutos não são frequentes (Cantero, 1997), para que isso aconteça são necessários anos em que haja chuva abundante, no final do Verão- princípios de Outono (Trapero e Blanco, 2004).

- Sintomatologia

Manifestação de lesões nas folhas, podendo também ocorrer nos frutos. Na página superior da folha podem observar-se manchas cloróticas, pouco definidas, podendo evoluir para necroses, principalmente no ápice (Trapero e Blanco, 2004). Na página inferior podem observar-se manchas acinzentadas e difusas que correspondem às frutificações do fungo (Trapero *et al.*, 1998) (figura 9).



**Figura 9 - Cercosporiose em folha (Fonte: Syngenta 2016).**

No fruto em verde, podem observar-se lesões redondas, deprimidas e de cor ocre ou castanha, passando para uma tonalidade acinzentada ou azulada, desenvolvendo um halo amarelo (Trapero e Blanco, 2004). Na zona infetada, os tecidos endurecem (Cantero, 1997), fazendo com que os frutos não amadureçam corretamente, terminando alguns por mumificar (Trapero e Blanco, 2004) (figura 10).

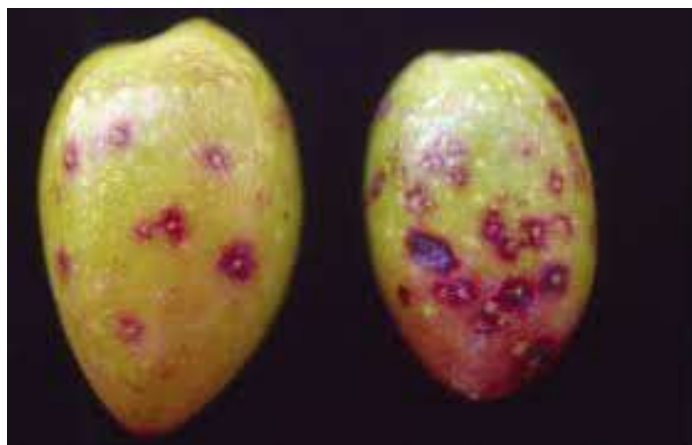


Figura 10 - Cercosporiose em fruto (Fonte: Syngenta 2016).

- Etiologia e epidemiologia

A cercosporiose pode confundir-se, por observações menos experientes, com o olho-de-pavão, sobretudo quando ambas coexistem na mesma planta (Del Moral e Medina, 1985), à semelhança deste, em anos e/ou zonas com presença de muita humidade, compassos de plantação muito densos, solos mal drenados e regados, criam as condições ideais para o seu desenvolvimento.

A epidemiologia é semelhante à de *Fusicladium oleagineum*, tanto em época de infeção, como em período de incubação e meios de dispersão (Trapero e Blanco, 2004). O desenvolvimento do fungo dá-se através de estromas que se formam a partir do micélio, sob a epiderme dos tecidos infetados, originando massas escuras de conidióforos que emergem, rompendo a epiderme (Trapero e Blanco, 2004). Por ação do vento e da chuva, os conídios separam-se dos conidióforos, tendo principalmente uma dispersão descendente (Trapero, s/d). A temperatura de 20-22°C oferece condições ideais de germinação, sendo no entanto também necessária a existência de água livre nos tecidos, ou humidade relativa elevada. Ao contrário de *Fusicladium oleagineum*, *P. cladosporioides* parece ter condições para se desenvolver melhor em folhas velhas (Trapero *et al.*, 1998).

- Meios de Proteção

Normalmente os tratamentos efetuados para o olho-de-pavão, são eficazes e suficientes para prevenir esta doença utilizando-se sobretudo produtos cúpricos (Garcia, 1991; Tjamos *et al.*, 1993).

Na ocorrência de ataques no ano anterior e a registarem-se condições para o desenvolvimento da doença, deve realizar-se um tratamento antes das primeiras chuvas outonais, desta forma as folhas estarão protegidas, quando ocorrer a esporulação (Trapero *s/ d*; Trapero e Blanco, 2004).

### **3.2.6 Verticiliose (*Verticillium dahliae* Klebahn)**

A verticiliose, causada pelo fungo *Verticillium dahliae*, é uma doença vascular, de grande dispersão em regiões temperadas, podendo afetar várias culturas herbáceas e lenhosas, é considerada atualmente, como uma importante doença dos olivais europeus (Ruggieeri, 1946 citado por Jiménez-Díaz, 1997).

- Sintomatologia

Os sintomas na árvore depende de várias variáveis, como a velocidade com que se desenvolvem as toxinas que impedem a circulação de água e nutrientes, das raízes às folhas, dependendo esta da virulência do fungo, da variedade e sua suscetibilidade assim como das condições ambientais (Jiménez-Díaz, 1997). Segundo Vigoroux (1975), podemos ter um período de incubação de cerca de dois anos (citado por Jiménez- Díaz, 1997).

Pode manifestar-se por dois tipos de sintomatologia, uma apoplética ou forma aguda e dessecação lenta ou forma crónica, distinguindo-se pela natureza dos sintomas, pela altura do ano em que se manifestam e pela rapidez de desenvolvimento (Jiménez-Díaz, 1997; 1998; Trapero e Blanco, 2004).

- Etiologia e epidemiologia

O fungo é constituído por conídios unicelulares, forma microesclerotos globosos e alongados, pretos, estrutura que lhe permite sobreviver vários anos, nos pecíolos das folhas caídas no solo (Kelley *et al.*, 1983). Tem dois patótipos, um desfoliante e outro não

desfoliante, distinguíveis apenas molecularmente (Mercado- Blanco *et al.*, 2001; 2002; Pérez- Artés *et al.*, 2005).

Os microesclerotos germinam, respondendo ao estímulo químico produzido pelo sistema radicular da oliveira, e penetram nas raízes das árvores. Uma vez instalado no solo, é necessário proceder a uma solarização ou desinfecção da área (métodos bastante dispendiosos) para o eliminar.

- Meios de Proteção

Não existem neste momento meios diretos de proteção para a verticiliose, no entanto medidas preventivas, como a utilização de material vegetal certificado (Rodríguez- Jurado *et al.*, 1993), o uso de porta enxertos resistentes ou tolerantes (Colella *et al.*, 2005). O recurso à sideração de gramíneas (Jiménez- Díaz, 1997; Xiao *et al.*, 1998; Block *et al.*, 2000; Trapero e Blanco, 2004) de brássicas (Stone *s/ d*; Blok *et al.*, 2000; McGuire, 2003) ou a utilização de serrim de madeira (Wilhem e Taylor, 1965) parece ter interesse, uma vez que favorece o desenvolvimento e a atividade dos antagonistas, libertando compostos químicos de ação fungicida e fungistática.

### **3.2.7 Escudete (*Camarosporium dalmaticum* (Thum) Zachos e Tzav- Klon)**

Doença que se manifesta por necroses côncavas nos frutos, sendo habitual nos olivais da região Mediterrânica, no entanto em Portugal tem tido pequena importância económica.

- Sintomatologia

É uma patologia, exclusiva do fruto. Sintomatologicamente caracteriza-se pelo aparecimento de uma necrose côncava arredondada com diâmetro variável (3 a 6 mm) de cor acastanhada, apresentando um bordo sobrelevado de cor castanha mais escura, estes sintomas podem ser visíveis ainda com o fruto verde. Pode haver evolução da necrose, destruindo todo o fruto por desidratação (figura 11). Os frutos atacados perdem qualidade, aumentando o seu valor de acidez e sabor.

- Etiologia e epidemiologia

Forma conídios unicelulares (esporos assexuados) no interior de picnídios que se encontram nas necroses dos frutos (Cantero, 1997). Tem capacidade de hibernação sob a forma de picnídios, nos frutos atacados, quer permaneçam na árvore, quer tenham caído ao solo.

Consegue desenvolver-se, em condições de humidade na ordem dos 40 a 50% e temperatura superior a 25°C (Cantero, 1997). No entanto é necessário que chova para os conídios saírem dos picnídios e dispersarem a doença (Trapero e Blanco, 2004). As feridas na epiderme dos frutos são facilitadores da contaminação, sendo a mosca da azeitona, considerada o principal agente.



**Figura 6 - Escudete (Syngenta, 2016).**

- Meios de Proteção

Não existem meios de proteção, específicos para o controlo do escudete. Os meios que são utilizados para controlar a mosca da azeitona e o olho de pavão, ajudam no controlo indireto da doença (Trapero e Blanco, 2004).

### 3.2.8 Antracnose (*Colletotrichum* spp.)

A antracnose, é uma das doenças que mais afeta os olivais Portugueses, e do mundo, é provocada pelos fungos do género *Colletotrichum*, sendo estes responsáveis pelas antracnoses de diversos frutos contribuindo para importantes quebras nos rendimentos provenientes da cultura. No olival, está associada a uma diminuição de rendimentos, que se devem tanto à queda dos frutos atacados, como aos frutos atacados pelo fungo que são levados até ao lagar, levando a um aumento da acidez e depreciação do azeite, com conseqüente desvalorização deste (Souza *et al.*, 2005).



Figura 12 - Fruto com Gafa.

Na antracnose associada à oliveira, foram identificadas várias espécies de fungos, pertencentes ao género “*Colletotrichum*”.

Estas espécies dividem-se entre o complexo *Colletotrichum acutatum* de que fazem parte parte as espécies (*C. nymphaeae*, *C. fiorinae*, *C. godetiae*, *C. acutatm*, *C. rhombiforme* e *C. simmondsii*) e o complexo *Colletotrichum gloeosporioides* onde está incluído o *C. gloeosporioides*.

Em Portugal, as espécies *C. nymphaeae*, *C. acutatum* e *C. godetiae*, juntas atingem níveis superiores a 95%, (Materatski *et al.*, 2018). A cultivar ‘Galega vulgar’ é a mais sensível, sendo que em zonas húmidas pode chegar-se a ter perdas de 50% da produção de azeite (Azevedo, 1976). Um estudo realizado, entre 2004 e 2006 na região do Algarve,



mostra que a doença apresentava uma incidência de 22% nos anos secos e de 85%, nos anos mais húmidos (Talhinhas *et al.*, 2009).

- Sintomatologia

A sintomatologia mais característica pode observar-se nos frutos maduros, podendo o ataque dar-se em qualquer parte do fruto, é no entanto mais comum, ser observado na zona apical (Mateo- Sagasta, 1968), como se pode observar na figura 12. Sempre que exista humidade, sobre as lesões, normalmente surgem órgãos de frutificação assexuados, os acérvulos que emitem uma substância gelatinosa, alaranjada, com grande concentração de esporos (Mateo-Sagasta, 1968; Moral e Trapero, 2009).

O fungo infeta os frutos, através de feridas causadas fisiologicamente ou por vectores, como a *Bactrocera oleae*, ou ainda através da epiderme degradada através de enzimas produzidas pelo apressório. Penetrando posteriormente com as hifas as células da epiderme e em seguida do mesocarpo do fruto (figura 13) (Bayley *et al.*, 1992).

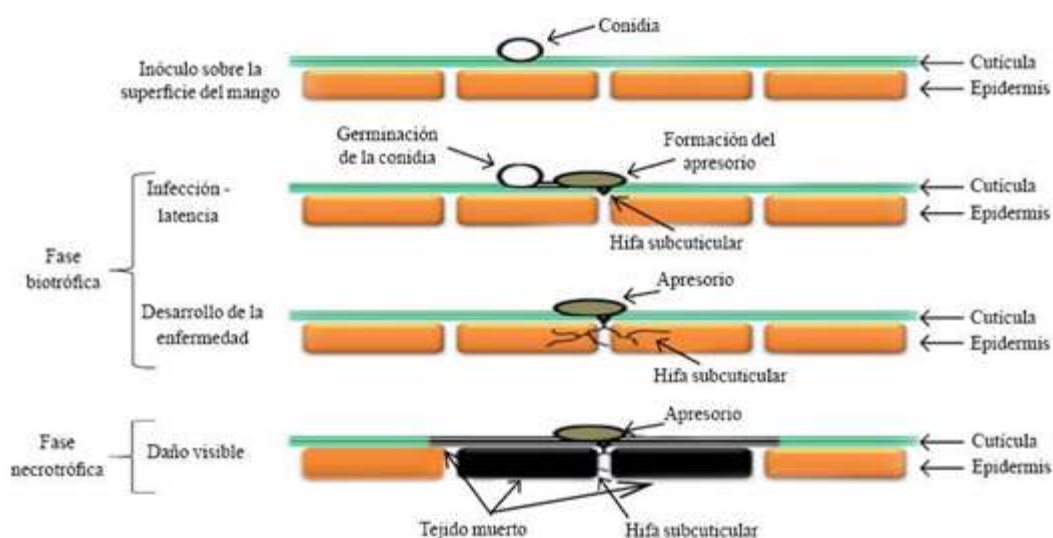


Figura 13 - Fases da infecção de *Colletotrichum* spp. no fruto (Adaptado de Bayley *et al.*, 1992).

A doença apresenta dois sintomas, um nos frutos (podridão e mumificação), outro na árvore (desfoliação e dissecação de ramos).

O primeiro e que genericamente identifica a doença caracteriza-se pelo aparecimento inicial de necroses em depressão, de forma arredondada, com coloração



ocorre a acastanhada, de aspeto oleoso. Após entrada nos frutos, o fungo desenvolve o micélio e a partir daí formam-se os acérvulos, órgãos de frutificação do fungo, sendo normal apresentarem-se rodeados por longas coroas esbranquiçadas de hifas (Graniti *et al.*, 1993). Os acérvulos, após iniciarem a sua maturação, começam a sair para o exterior, através de fendas na epiderme dos frutos, libertando os conídios, que se encontram aglomerados em massas mucilaginosas de cor alaranjada (Graniti *et al.*, 1993; Amaro, 1997). Estas necroses vão alastrando e o fruto apresentará um aspeto de podridão total, seguida de desidratação, que levará ao processo de mumificação, seguida de necroses nos pedúnculos, com conseqüente queda prematura dos frutos. Este processo, é devido à esporulação, ou reprodução assexuada, onde a chuva separa os conídios da massa gelatinosa dos acérvulos e os dispersa. Para que possa ocorrer a germinação é necessário que exista água livre, na superfície do fruto (Trapero e Roca, 2004). Na esporulação os conidióforos, hifas reprodutivas assexuadas, produzem na sua extremidade os conídeos, esporos responsáveis pela dispersão do fungo. Quando os conídeos ficam maduros são libertados e transportados, pelo vento e pela chuva e quando encontram um local que lhes permita desenvolver-se, vão transformar-se numa nova infeção (Cantero, 1997). Podem ser infetados frutos verdes, mas preferencialmente os esporos infetam frutos maduros, sendo que os frutos sintomáticos que forem transformados em azeite irão depreciar a sua qualidade, provocando-lhe um aumento da acidez e alterando as características organoléticas negativamente (Carvalho *et al.*, 2004).

O segundo sintoma pode ou não ser observado, dependendo da severidade do ataque e/ou da cultivar afetada, na cultivar 'Galega' é de fácil observação, os ramos e raminhos secos. Consiste na desidratação, seguida de desfoliação e morte apical dos ramos, contribuindo para debilitar a árvore, afetando a produção do ano seguinte. Ao contrário do *Fusicladium oleagineum* e *Pseudocercospora cladosporioides*, os ramos atacados pelo fungo, necrosam completamente e não produzem novos rebentos.

Um estudo efetuado por Talhinhos *et al.* (2011) refere o grupo complexo *Colletotrichum acutatum* como o mais frequente (80%), tendo sido observadas variações geográficas nas frequências dessas populações, que acompanhavam as mudanças populacionais ano a ano.

Estudos epidemiológicos e histopatológicos, realizados mostraram a presença deste agente patogénico em órgãos vegetativos durante todo o ano, especialmente em folhas e ramos de oliveira e infestantes. Estes representam reservatórios de inóculo onde

ocorre a conidiação secundária, os conídeos são então dispersos pelas chuvas de primavera atingindo flores e frutos jovens ou por chuvas de outono atingindo os frutos em pré-maturação. Os frutos verdes colonizados não apresentam sintomas até à penetração da cutícula, ficando a colonização e a produção de sintomas completa apenas quando os frutos amadureceram (Talhinhas *et al.*, 2011).

Num outro estudo concluiu-se que a dissecação e necroses dos ramos, só acontece em ramos onde previamente houve um grande ataque em frutos, sendo devido a toxinas produzidas pelo agente patogénico dos frutos atacados (Moral *et al.*, 2009).

Pode ainda existir contaminação através de ascósporos, que são originados pela reprodução sexuada do fungo e que podem também ser dispersados com facilidade pelo vento (figura 14).

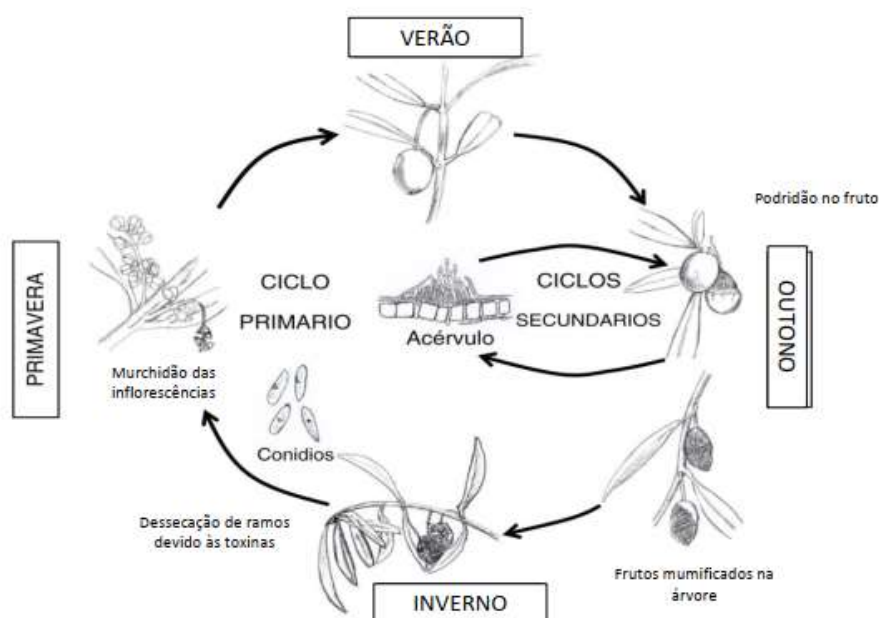


Figura 14 - Ciclo patogénico da Antracnose da oliveira causada por *Colletotrichum* spp. (Adaptado de Trapero *et al.*, 2008).

Para se desenvolver o fungo necessita de humidade e temperatura amena. A esporulação precisa de humidade relativa superior a 90% e temperaturas entre os 20 e 25°C (Azevedo, 1976).

A chuva é necessária para a separação dos conídios, da massa gelatinosa dos acérvulos e para a sua dispersão através do efeito “splash” das gotas de chuva. (Trapero e Roca, 2004).

Para além das condições ambientais, existe ainda a suscetibilidade das diferentes cultivares ou variedades, os ataques de *Bactrocera oleae*, que tornam até as variedades mais resistentes, suscetíveis, para além de condições técnicas no olival, que podem potenciar ou dificultar a dispersão do fungo, como, regas em excesso, solos mal drenados ou o de grau maturação dos frutos (Trapero e Blanco, 2004).

- Etiologia e epidemiologia

Inicialmente o agente causal responsável pela doença foi o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, no entanto estudos mais recentes, apontam para que o principal agente causal seja a espécie *C. acutatum* (Martín e Garcia-Figueres, 1999; Perez *et al* 2005). A dispersão desta espécie parece contudo ter sido mais recente comparando-a com *C. gloeosporioides*. Nas graves epidemias entre 1997- 2000 que assolaram a região de Andaluzia em Espanha, a espécie maioritariamente identificada, foi *C. acutatum*, dando a indicação de uma melhor adaptação da mesma às condições da região (Oliveira e Trapero, 2001).

Como medida de clarificação da etiologia da doença, caracterizaram-se morfológica e molecularmente as várias espécies de *Colletotrichum* (Talhinhas *et al.*, 2003 a; 2003 b; Caciola *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2005).

Os conídios de *Colletotrichum spp.* apresentam forma unicelular, hialinos e de forma cilíndrica ou elipsoidal, na sua germinação, desenvolvem um tubo germinativo, podendo originar micélio e conídios secundários, ou formar apressório e hifa de penetração, colonizando o hospedeiro pela forma subcuticular- intracelular hemiobiótica ou intercelular necrotrófica, ficando a diferença a depender do tecido infetado (Diéguez-Uribeando *et al.*, 2005).O fungo consegue penetrar na epiderme intacta, uma vez que produz enzimas, que lhe permitem degradar as células da epiderme, no entanto a existência de feridas, facilitam a sua entrada. No caso da azeitona, a mosca da azeitona *Bactrocera oleae*, facilita a entrada do fungo, tanto pelo orifício provocado pelo oviscapo, aquando da postura do ovo, como pelo orifício de saída da larva. Após entrar dentro dos frutos, o fungo desenvolve o micélio intercelularmente, a partir do qual se vão formar os acérvulos subepidérmicos, normalmente estão rodeados por longas coroas periféricas esbranquiçadas de hifas (Graniti *et al.*, 1993).

Os conídios apresentam um poder germinativo invariável durante 15 dias, reduzindo-se entre os 15 e os 30 dias, sendo completamente destruído depois de 30 dias, ainda

conseguem suportar 2 a 3 horas de exposição ao sol, sem perderem capacidade de germinação. (Cantero, 1997; Trapero e Blanco, 2004).

Quando a humidade não é um dos fatores limitantes ao desenvolvimento do fungo, apresenta-se outra variável a ter em conta, a temperatura. A germinação dos conídios dá-se no intervalo de 0 e 30°C. Aos 25°C os conídios necessitam apenas de 2h para se desenvolverem, já entre 0- 5°C necessitam de 8 horas, neste intervalo, apenas 60% germinam e abaixo dos 5°C ou superiores a 30°C só germinam 10%. A penetração nos frutos dá-se portanto, através de feridas ou da pele intacta, sendo o período de incubação variável consoante a temperatura média (tabela 2).

**Tabela 2- Relação entre temperatura e período incubação (Anónimo).**

Temperatura média (°C)	Período de incubação (dias)
25	4 a 6
20	5 a 7
15	7 a 10
10	10 a 15

Sabe-se atualmente que o agente causal da gafa pode estar sistemicamente distribuído na parte interna de árvores afetadas, dando origem às infeções primárias da doença. Fungos do género *Colletotrichum* foram encontrados dentro dos feixes vasculares, bem como em botões florais ainda fechados e também no interior de frutos antes do endurecimento do endocarpo (Materatski *et al.*, 2018). Esta nova evidência pode fazer a diferença na escolha dos meios de tratamento para prevenir a doença.

- Meios de Proteção

Dos meios de proteção desta doença, faz parte o controlo da mosca da azeitona, uma vez que os orifícios abertos por esta na postura e saída das larvas constituem uma porta de entrada facilitadora, para o fungo (Trapero e Blanco, 2004).

As podas, com o objetivo de abrir o interior da copa e compassos de plantação mais espaçados, permitindo um maior arejamento e iluminação da mesma, a destruição de folhas e frutos com inócuo, caídos no chão e se necessário a antecipação de colheita, ajudam no controlo eficaz da doença.

Para o combate químico estão homologadas substâncias ativas de contacto como o hidróxido, o oxiclureto e o sulfato de cobre, sendo que ultimamente, os olivicultores têm podido contar com alguns produtos fungicidas como a “trifloxistrobina”, com mobilidade lateral e translaminar, com ação preventiva e curativa, demonstrando eficácia no combate ao fungo.

### **3.3 Efeito da aplicação de cálcio na proteção dos frutos a doenças.**

O cálcio é um constituinte estrutural das células, tem pouca presença em atividades enzimáticas ou fluxo via floémica e é pouco redistribuído na planta, como consequência os órgãos onde se nota a sua deficiência, são os mais jovens, como é pouco móvel no solo, a sua absorção ainda pode ser comprometida quando existe a presença de outros nutrientes no solo como o potássio, sendo as plantas dicotiledóneas mais exigentes no nutriente, do que as monocotiledóneas (Ribeiro *et al.*, 2007). Com este princípio de pouca mobilidade no solo e podendo a sua absorção ser comprometida por outro nutriente presente no solo, optou-se por aplicações foliares do nutriente.

Sendo o cálcio reconhecido como um elemento essencial à proteção dos frutos, desde os trabalhos de DeLong (1936; 1937) e Garman e Mathis (1956), citados por Ferguson e Watkins (1989), estando baseados na relação entre a presença do  $\text{Ca}^{2+}$  nos frutos e a não incidência “bitter pit” após o armazenamento. O  $\text{Ca}^{2+}$  tem um papel importante ao nível da lamela média, ligando-se às pectinas da lamela média, promovendo uma maior rigidez aos tecidos dos frutos (Ferguson e Drobak, 1988). Neste princípio, também essa resistência e rigidez, é conseguida nas células da epiderme dos frutos, conseguindo-se assim uma maior resistência à degradação da epiderme e consequente aumento de resistência a fatores adversos ao fruto, como a antracnose.

Engelsdorf *et al.* (2016) referiu num estudo, que a resistência à penetração de fungos na parede celular, estava dependente da ligações pectidicas da parede, deste modo reforçar as ligações das pectinas nas paredes celulares da epiderme permite aumentar a resistência à entrada de fungos no interior dos frutos.

O  $\text{Ca}^{2+}$  apresenta uma atuação como mensageiro secundário, ligando-se à proteína calmodulina, desencadeando este complexo uma resposta biológica (Taiz e Zeiger, 1991).

Das várias enzimas, que são ativadas pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ - calmodulina, encontram-se as bombas de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$  - ATPases) localizadas na membrana plasmática (Salisbury e Ross, 1992).

Na constituição da folha, a última camada é formada por polissacarídeos, estes têm ligações com carga elétrica negativa, onde os radiais dos catiões de cálcio se vão ligar, permitindo a entrada destes através da cutícula foliar (Salisbury e Ross, 1992).

Em maçãs, foi observado que o cálcio tem uma função de reforço ou aumento da firmeza da fruta, uma vez que estabiliza a parede celular dos frutos, através da sua ligação aos grupos carboxílicos das pectinas, atrasando a degradação enzimática da fruta (Ranjbar *et al.*, 2018).

Num estudo realizado nos EUA, observou-se o papel do cálcio, na proteção da maçã contra a *Botrytis cinerea*. Observou-se que os frutos onde não tinha sido aplicado o cálcio, apresentaram alterações ao nível da degradação da epiderme mais rápidas que os que tinham recebido uma aplicação (Ranjbar *et al.* 2018).

Cerca de 60% do cálcio total na célula, está localizado na parede celular, na região da lamela média, onde exerce um efeito estabilizador, reforçando os polímeros pécticos, conferindo rigidez às paredes celulares, de acordo com o modelo “caixa de ovo”. A formação de ligações cruzadas de cálcio entre os polímeros pécticos tornam as paredes celulares mais resistentes às enzimas produzidas por fungos patogénicos como a *Botrytis cinérea* (Ranjbar *et al.* 2018).

Para melhorar a firmeza da maçã “Fuji”, durante a cadeia pós- colheita, foram realizadas sete aplicações foliares de cálcio em pré- colheita, 81 a 123 dias após a plena floração, observando-se uma preservação da lamela média, reforçando as pectinas e consequentemente a firmeza dos frutos, as aplicações de cálcio parcialmente suprimiram a pectinametilesterase, pectato liase, galactosidase, arabinofuranosidase e xilosidase, sem qualquer relação aparente com as taxas de produção de etileno (Ortiz A. *et al.*, 2011).

As paredes celulares vegetais, em particular as dos frutos e legumes (tabela 3) apresentam na sua composição uma importante proporção de pectinas. As pectinas são polissacarídeos que são um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas e o principal componente da lamela média (Goldberg, 1985).

Tabela 3- Proporções relativas dos componentes das paredes celulares dos frutos, legumes e cereais (Brett e Waldron, 1996).

Componente	Frutos e Legumes	Endosperma de Cereais	Farelo de Cereais
Celulose	35	3	30
Hemiceluloses	15	84	50
<b>Pectinas</b>	<b>40</b>	1	0,1
Proteínas	5	7	8
Compostos fenólicos	5	5	11,9

A aplicação de cálcio pode traduzir-se na forma “orgânica” de aumentar a conservação de frutos e legumes sem recorrer à aplicação de fitofarmacêuticos. Shear (1975), citado por Conway (1994), chegou à conclusão que mais de 30 distúrbios fisiológicos, identificados em várias culturas, se deviam à falta deste nutriente. Conway (1994), refere ainda que Sharples e Johnson (1977) conseguiram reduzir as perdas de armazenamento em maçã, por *Gleosporium spp.*, através de aplicações com  $\text{Ca}^{2+}$  em pré-colheita, da mesma forma que os dados encontrados através deste trabalho nos apresentam uma maior resistência ao fungo, nos frutos que receberam as aplicações de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Localização do ensaio

Os ensaios realizados neste trabalho decorreram num olival, com oliveiras da cultivar 'Galega vulgar', cultivadas em modo tradicional e de sequeiro, localizado na freguesia de Campinho, concelho de Reguengos de Monsaraz, distrito de Évora, no Alto Alentejo, nas coordenadas geográficas 38°22'26.42''N e 7°29'21.34''W, encontrando-se entre as cotas de 150 m e os 200 m acima do nível médio das águas do mar.

As culturas circundantes são olival, vinha e algumas culturas arvenses (figura 15).





Figura 15 – Localização da parcela de ensaios “Olival de Stª Maria” (Google Earth 2017).

## 4.2 Caracterização climática da zona

Segundo as estações climáticas da “ATEVA” na zona, o número médio de horas de sol é de 2950 por ano, com uma temperatura média de 16°C, mas podendo sofrer amplitudes térmicas superiores a 25°C, com valores médios de radiação global de 155 cal/Km<sub>2</sub>, ventos dominantes de NW e NE e uma precipitação total anual entre os 400 e os 600mm.

## 4.3 Tipo de solo

Para identificar e caracterizar o solo do local onde se localizou o ensaio, foi utilizada a carta de solo a ela associada, tendo estas sido tratadas com recurso ao programa ArcGis (ESRI, 2011).

O tipo de solo predominante segundo Cardoso (1965) é mediterrâneo pardo, não calcário, para-barros de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins (Pm), e solos calcários, pardos associados a depósitos calcários (Pcg).

É um solo com uma textura franco-argilosa-arenosa, a franco-argilosa calcária, com alguns calhaus e pedras da rocha mãe e/ ou de pórfiros, apresentando estrutura granulosa muito fina a média moderada; friável. Estrutura granulosa ou grumosa fina moderada a fraca (figura 16).



Apresenta um pH entre 6,0 e 8,0.

## Carta de Solos

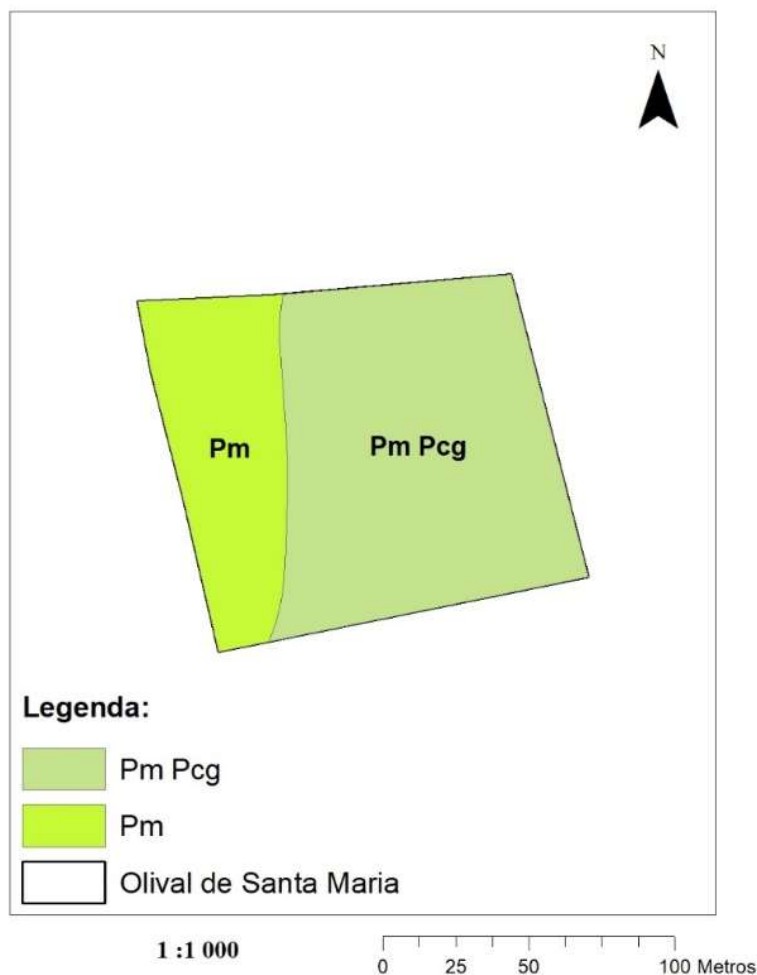


Figura 16 - Carta de Capacidade de Uso de Solos.

### 4.4 Descrição da parcela e itinerário cultural

A área total da parcela é ocupada por olival, num compasso de 10x10 perfazendo 100 árvores por hectare, da cultivar 'Galega', explorada em sequeiro. As árvores possuem uma idade entre os 70 e os 90 anos. O solo é mobilizado no fim da Primavera, início do Verão, como forma de controlo de infestantes. Durante o Verão é feito um nivelamento, recorrendo a um rojão, pretendendo-se deixar o mais homogéneo possível, tanto para facilitar a colheita e recolha da azeitona, mas também de forma a não existirem fendas

(figura 17) no solo durante o Verão (devido à presença de montmorilonite na constituição deste solo) que promovam a perda de humidade do solo para a atmosfera.



Figura 17 - Exemplo de fendas em solo franco-argiloso; Serpa.

#### 4.5 Instalação e Condução do Ensaio

O ensaio foi instalado no início do mês de Agosto, sendo delineado de forma, a que os diferentes tratamentos não interferissem uns com os outros. Dessa forma foram deixadas duas linhas de plantas entre cada modalidade de tratamento, de forma a formarem uma barreira de segurança (figura 18). Entre cada linha do ensaio, existe uma distância de 30m.

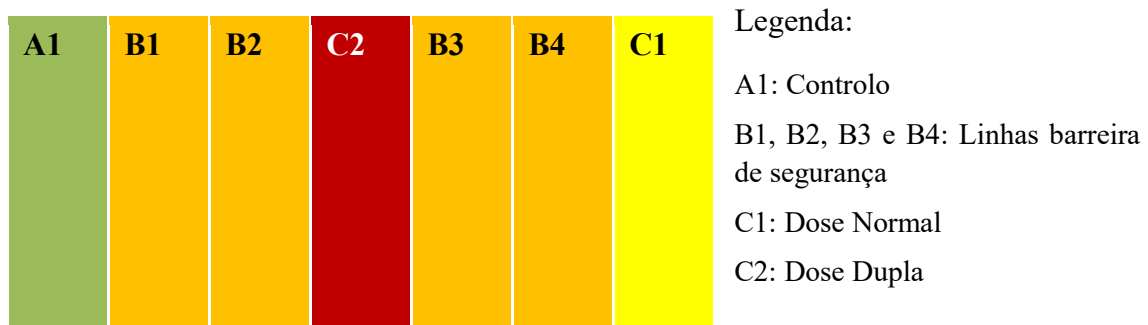


Figura 18 – Esquema do ensaio.

No esquema apresentado na figura 18, a linha A1 corresponde à linha de repetições de plantas sem qualquer aplicação de tratamento, a linha C2 a linha de

repetições de plantas com aplicação de dose dupla de tratamento, a linha C1 a linha de 6 repetições de plantas com aplicação de dose normal do tratamento e as linhas B1 a B4, linhas de barreira de segurança. Em cada uma das linhas encontram-se 18 árvores, sendo utilizadas para o ensaio apenas 14, deixando 2 em cada ponta, como barreira de segurança.

**Tabela 4 - Datas das aplicações de cálcio.**

<b>Aplicações</b>	<b>Data</b>
1 <sup>a</sup>	09-08-2017
2 <sup>a</sup>	28-08-2017
3 <sup>a</sup>	18-09-2017
4 <sup>a</sup>	09-10-2017

Foram realizadas 4 aplicações de cálcio (tabela 4) através do método de pulverização por turbina, movida por trator agrícola, sob a fórmula de ião “formiato de cálcio” (CaO), comercializado com a marca de “Calfinish” sob patente comercial da “Nutrisapec Tradecorp Portugal”, tendo sido feitas na altura correspondente ao maior desenvolvimento do mesocarpo do fruto e acumulação de gordura (Cordeiro, 2016), desde o início de Agosto, até ao início de Outubro. À dose normal correspondeu a quantidade de 2kg/ ha e à dose dupla a quantidade de 4kg/ ha. Estas doses foram definidas pela dose normal recomendada pelo fabricante do produto e neste trabalho estudou-se a aplicação de uma dose dupla da recomendada.

#### **4.6 Colheita de amostras**

Recolheram-se amostras de frutos em quatro fases distintas (tabela 5). Na fase 0, teve-se como objetivo verificar a existência de formas latentes de infeção, enquanto nas fases 1, 2 e 3, pretendeu-se quantificar o número de frutos sintomáticos ao fungo *Colletotrichum nymphaeae*. Cada uma das fases de amostragem teve como objetivo, representar uma etapa da maturação do fruto. A colheita foi realizada sempre nos 4 quadrantes da copa, à altura do peito, em 8 das 14 árvores de cada linha, escolhidas aleatoriamente.

A fase 1, o início da maturação (transição de cor, esverdeado para violeta) corresponde ao período de início de colheita na variedade 'Galega vulgar' na zona do ensaio.

**Tabela 5 - Datas de recolhas de amostras das diferentes fases.**

Fase	Data
0	17-10-2017
1	23-10-2017
2	30-10-2017
3	14-11-2017

Na fase 2, a maturação violácea (frutos violáceos) em que idealmente se deveria realizar a colheita, devido ao maior rendimento em azeite (*vide* figura 22C), a fase 3 de plena maturação (frutos totalmente negros) onde em alguns casos, pode ocorrer um aumento de peso pelas chuvas Outonais, mas não um aumento de rendimento do fruto em gordura. A cada uma destas fases correspondem as diferentes fases de colheita utilizadas na zona para a cv. 'Galega vulgar', sendo que a fase 1 é utilizada para obtenção de azeites mais frutados e verdes, a fase 2 na altura em que o fruto tem maior acumulação de gordura e a fase 3 (figura 19) que corresponde à plena maturação, em que se existir pluviosidade poderá ocorrer um aumento do peso dos frutos, pela acumulação de água, mas não um aumento do teor de gordura (Cordeiro, 2016).



**Figura 19 - Colheita de amostras no campo variedade 'Galega vulgar'; Stª Maria.**

A dimensão desta amostra foi considerada, tendo em conta a utilização futura dos frutos (cerca de 900 frutos em cada fase e em cada tratamento). Parte dos frutos colhidos inicialmente foi utilizada para inoculação. A outra parte foi utilizada para determinar o teor de cálcio presente na parede celular dos frutos.

## **4.7 Inoculação e incubação dos frutos**

### **4.7.1 Observação das formas latentes**

Inicialmente foram usados 110 frutos por cada “tratamento”, numa fase definida como a Fase 0, tal como se pode observar na tabela 5. De acordo com a metodologia adaptada de Moral *et al.* (2009), os frutos foram desinfetados em hipoclorito de sódio a 1% e posteriormente lavados em água destilada, para eliminar possíveis fungos saprófitas e fungos fitopatogénicos presentes no exterior dos frutos, antes de serem colocados em incubação, com humidade a 90% e temperatura de 25°C.

O objetivo foi observar, a possibilidade de existência de formas latentes de *Colletotrichum spp.*, presentes nos frutos. Estes foram observados em intervalos semanais, até um máximo de 3 semanas.

### **4.7.2 Inoculação e incubação dos frutos**

Os frutos recolhidos das fases 1, 2 e 3 (tabela 5) foram todos inoculados, com o fungo *Colletotrichum nymphaeaea*.

As operações de manuseamento de todos os fungos usados neste trabalho decorreram em câmara de fluxo laminar equipada com lâmpada de ultravioletas e com um bico de Bunsen, de forma a diminuir o risco de contaminações dos microrganismos em estudo. O material de vidro, plástico e os meios de cultura utilizados foram sujeitos a esterilização em Autoclave (Uniclave 88 A.J. Costa), à temperatura de 120°C e pressão de 1 atmosfera durante 20min.

O fungo *Colletotrichum nymphaeae*, pertencente à coleção de fungos fitopatogénicos do Laboratório de Micologia, Universidade de Évora/Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas (ICAAM), foi repicado em placas de Petri

(90 mm), com meio de cultura 'Potato Dextrose Agar' (PDA), (Himedia) na proporção de 39 g em 1L de água miliQ (Millipore, Direc-Q<sup>®</sup> 5UV, Guyancourt, France), para posterior utilização durante o decorrer do trabalho.

O período de incubação e crescimento do fungo foi de 8 dias, a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . Após este tempo e depois de verificada a inexistência de contaminações, com os isolados provenientes de cultura pura de sete dias em PDA (Potato Dextrose Agar) realizou-se uma suspensão com água miliQ (Millipore, Direc-Q<sup>®</sup> 5U V, Guyancourt, France) numa concentração de  $10^6$ -  $10^7$  esporos/ml (Talhinhas *et al*, 2015). Esta é a concentração que permite a identificação de cultivares tolerantes e suscetíveis. A suspensão anteriormente preparada foi aplicada, a todos os frutos das diversas fases em estudo, pelo método de nebulização (figura 20).

Cada amostragem de cada modalidade foi de 300 frutos, tendo sido igualmente lavados em hipoclorito de sódio a 1% e posteriormente em água destilada, eliminando assim a contaminação por fungos saprófitas. Os 300 frutos foram divididos em cinco grupos de 60 frutos, ficando com 15 grupos de cada fase. Todos os grupos foram inoculados com a suspensão de *Colletotriccum nymphaeae*, tendo sido mantidos em condições de humidade e temperatura controlados (respetivamente 90% e  $25^\circ\text{C}$ ), sendo realizadas observações periódicas.





Figura 20 - Metodologia para Incubação e inoculação de *Colletotrichum*.

#### 4.8 Extração das paredes celulares

Testámos várias metodologias para a extração das paredes celulares da azeitona, que se encontram descritas na tabela 6. Nas primeiras 8 metodologias utilizou-se uma destilação com éter de petróleo para a extração da gordura. Este processo foi executado num equipamento automático designado Soxtherm, que nos permite a extração da gordura da pasta de azeitona, através da utilização de um solvente quente (éter), no entanto o método era demasiado moroso. Foi experimentada a metodologia nº 9, que foi a utilizada para a extração porque foi a que conduziu mais rapidamente a uma amostra desengordurada e aparentemente com menor teor em compostos fenólicos.

#### Metodologia adotada para extração das paredes celulares (método 9)

Para proceder à obtenção do AIR (matéria insolúvel em álcool= parede celular) utilizaram-se 200 frutos, por cada fase (3 fases) de cada tratamento (3 tratamentos), sendo estes divididos em três réplicas técnicas, estes foram lavados exaustivamente, descaroados e triturados durante 10 minutos a 200 RPM pelo “Ultraturrax”. A partir

deste homogeneizado pesaram-se cerca de 20g de matéria fresca à qual foi adicionada 60ml de água ultra pura aquecida a 70°C durante 10 minutos sob agitação, seguidamente a amostra foi filtrada através de filtro de “whatman nº2” e repetiu-se o processo. Em seguida a amostra foi colocada em 60ml de acetona e levada a 70°C durante 10 minutos sob agitação, sendo posteriormente filtrada e repetido o procedimento. Posteriormente a amostra foi colocada em 60ml de álcool durante 10 minutos, a 70°C, sob agitação. Por último foi filtrada e colocou-se em 80ml de Éter Dietílico (AnalaR Normapur®, VWR), deixando-se na “Hotte” até completa evaporação do solvente.

Tabela 6 - Resumo dos diferentes tratamentos realizados à amostra para posterior realização do AIR

Método	Procedimento
1	(Matéria fresca) lavagem com SDS 0,5% + Soxtherm
2	(Matéria fresca) lavagem com H2O + Soxtherm
3	Liofilizado da amostra após lavagem com SDS 0,5% + Soxtherm + lavagem com Acetona
4	Liofilizado da amostra após lavagem com H2O + Soxtherm + lavagem com Acetona
5	Matéria seca (estufa)
6	Liofilizado da amostra após lavagem com H2O + lavagem com Acetona + Soxtherm
7	Liofilizado da amostra após lavagem com SDS 0,5% + lavagem com Acetona + Soxtherm
8	(Matéria Fresca) lavagem 2x H2O+ lavagem 2x Acetona + Soxtherm
9	(Matéria Fresca) lavagem 2x H2O+ lavagem 2x Acetona + Álcool + Éter Diétilico

#### 4.9 Análise do teor de cálcio presente nos frutos

Para a análise do teor de cálcio dos frutos efetuou-se a extração das paredes celulares dos mesmos. Sendo a azeitona um fruto que contém na polpa um teor de gordura elevado necessitámos de previamente otimizar uma metodologia de extração das paredes celulares, com base no método de Coimbra *et al.* 1996.

O que pretendemos foi confirmar se os frutos sem sintomatologia, das aplicações de dose normal e dose dupla, tinham maior concentração de cálcio nas células da parede celular e se os frutos sintomáticos, sem aplicação, tinham menor concentração de cálcio, confirmando a tese de que a aplicação de cálcio aumenta os teores do ião cálcio nas



paredes celulares da epiderme dos frutos, induzindo um aumento de resistência à penetração de fungos.

### **Digestão Ácida do AIR**

Após a obtenção do AIR (Resíduo insolúvel em álcool) que corresponde à fração das paredes celulares pesaram-se cerca de 0.3 g de AIR, para dentro de cadinhos, que foram levados ao queimador e posteriormente para a mufla a 500°C durante 4 horas, para a obtenção de cinzas.

Depois da inceneração adicionaram-se às cinzas obtidas, 12 ml de HNO<sub>3</sub> (69%). A digestão ácida foi efetuada durante 1h no banho seco a 80°C, e após este período toda a amostra se apresentava totalmente translúcida. Deixou-se arrefecer um pouco e adicionam-se 10 ml de HCl a 0.5N e levam-se novamente as amostras a 80°C durante 15 min. Transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com H<sub>2</sub>O desmineralizada. Posteriormente filtrou-se o conteúdo para um frasco de polietileno de alta densidade. No filtrado foram quantificados os cátions por espectrofotometria de absorção atômica (figura 21). Nos resultados por espectrofotometria de absorção atômica, foi possível constatar que os valores de cálcio presentes nos frutos pertencentes ao “tratamento” controlo, apresentavam menor quantidade do nutriente, em relação ao “tratamento” da dose normal e esta igualmente apresentou valores de quantidade menor do nutriente, do que o “tratamento” da dose dupla.

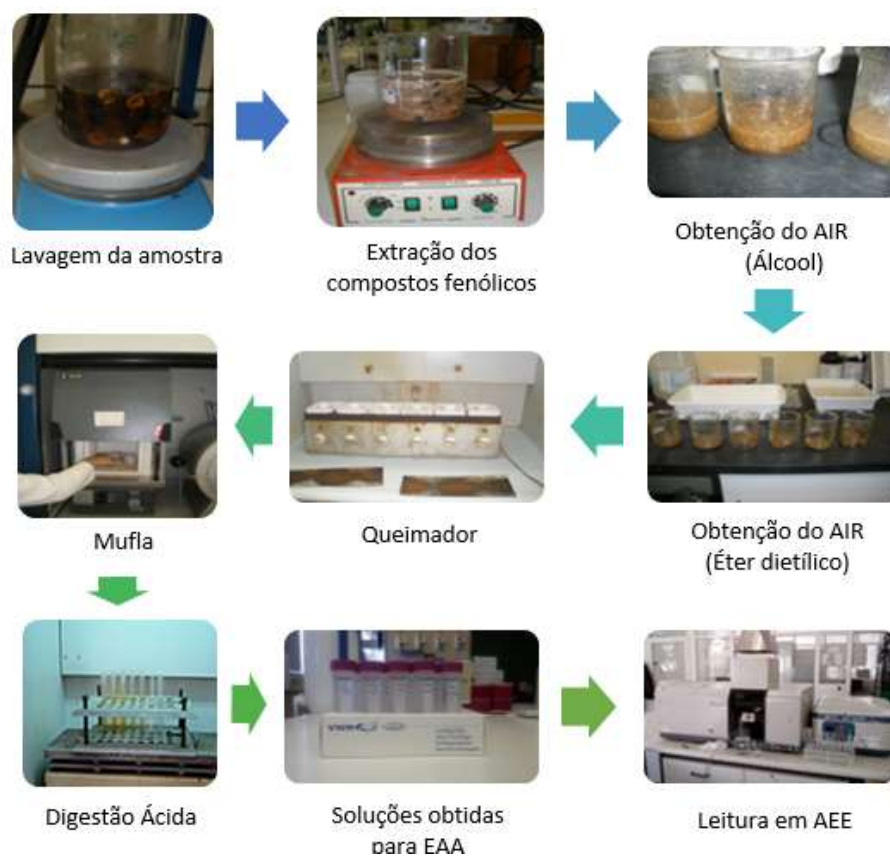


Figura 21- Metodologia de análise ao cálcio presente na parede celular.

#### 4.10 Análise estatística dos dados experimentais

Para análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* estatístico IBM SPSS v.20, comparações múltiplas das médias foram realizadas utilizando o teste Tukey HSD, com o objetivo de detetar diferenças significativas entre:

- A quantidade de frutos sintomáticos ao *Colletotrichum nymphaeae* no controlo, na dose normal e na dose dupla.
- A aplicação de cálcio na dose normal e dose dupla, e as diferenças apresentadas entre elas e entre o controlo, diferenças no teor de cálcio presente nos frutos e se existiu significância nessas diferenças.

Foi avaliada a quantidade de frutos sintomáticos e a percentagem de cálcio presente nos frutos em cada uma das fases e em cada ensaio, tendo os dados obtidos sido submetidos a análise de variância. Quando foram encontradas diferenças significativas entre dados, estes foram submetidos a uma análise de comparação de médias considerando-se um nível de significância para  $p < 0.05$ .

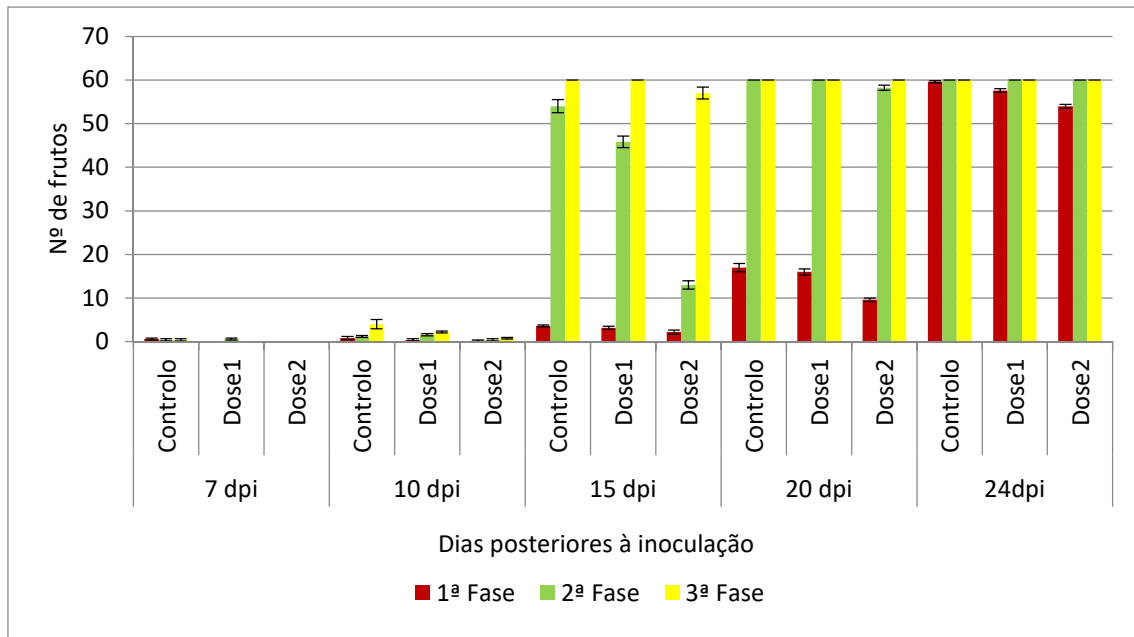


Figura 22 - Número de frutos sintomáticos ao *Colletotrichum* nas diferentes fases e tempos de observação periódica, com o respetivo erro padrão.

Assim nos primeiros 7 dias o número de frutos sintomáticos era muito baixo, próximo de zero sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Aos 10 dias foi realizada segunda contagem e constatou-se que só no controlo, entre a 1ª e a 3ª fase existiam algumas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) (figura 23).

Na primeira fase de maturação e após os 15 dias de inoculação o número de frutos com a presença de sintomas de antracnose variou entre  $2.2 \pm 0.49$  na dose dupla de cálcio e  $3.6 \pm 0.24$  no tratamento controlo, após os 20 dias de inoculação variou entre entre  $9.6 \pm 0.40$  na dose dupla de cálcio e  $17.0 \pm 0.95$  no tratamento controlo e após os 24 dias de inoculação variou entre entre  $54.0 \pm 0.45$  na dose dupla de cálcio e  $59.6 \pm 0.24$  no tratamento controlo. Na primeira fase de maturação a dose dupla de cálcio foi sempre significativamente maior ( $p < 0.04$ ) em comparação ao controlo e o tratamento com uma dose de cálcio em todos os tempos (figura 22).

Na segunda fase de maturação e após os 15 dias de inoculação o número de frutos com a presença de sintomas de antracnose variou entre  $13.0 \pm 0.95$  na dose dupla de cálcio e  $54.0 \pm 1.52$  no tratamento controlo, após os 20 dias de inoculação variou entre  $58.2 \pm 0.58$  na dose dupla de cálcio e  $60.0 \pm 0.00$  no tratamento controlo e após os 24 dias de inoculação todos os frutos de todas as variáveis (controlo, dose 1 e dose 2) apresentaram sintomas de antracnose. Na segunda fase de maturação a dose dupla de cálcio foi sempre significativamente maior ( $p < 0.003$ ) em comparação ao controlo e o tratamento com uma dose de cálcio em todos os tempos. Esta fase corresponde ao período ótimo de colheita da variedade 'Galega' (Cordeiro, 2016), apresentando os frutos com aplicação de dose dupla, menos 70% de frutos sintomáticos do que os frutos do controlo (tabela 6), esta fase apresenta importância particular, uma vez que corresponde, como referido atrás (ponto 4.6), à acumulação da maior parte da gordura acumulada no fruto e à sua colheita (figura 22).

Na terceira fase de maturação foi possível observar diferenças aos 10 dias de inoculação, o número de frutos com a presença de *Colletotrichum* variou entre  $0.8 \pm 0.20$  na dose dupla de cálcio e  $4 \pm 1.05$  no tratamento controlo. Após os 15 dias de inoculação o número de frutos com a presença de *Colletotrichum* variou entre  $57 \pm 1.34$  na dose dupla de cálcio e  $60.0 \pm 0.00$  no tratamento controlo, após os 20 dias de inoculação todos os frutos de todas as variáveis (controlo, dose 1 e dose 2) apresentam-se sintomáticos ao *Colletotrichum*. Na terceira fase de maturação a dose dupla de cálcio, a dosagem simples e o controlo não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) (figura 22).

A aplicação de cálcio em frutos há muito que é testada com o objetivo de melhorar a qualidade. Em maçãs aplicações em pré colheita, resultaram em frutos com maior dureza e maior qualidade organolética (Iuchi *et al.*, 2001; Ranjbar *et al.*, 2018). Também em cereja, a aplicação de cálcio em pós colheita, resultou em frutos mais firmes, com uma maior resistência à perda de água e a doenças (Belgue *et al.*, 2017).

No entanto a aplicação de cálcio em pós colheita em morango, segundo Figueroa *et al.* (2012), não foi vantajosa para a qualidade e conservação dos frutos. Com efeito os morangos pertencem a um grupo de frutos, cujo processo de amadurecimento é diferente dos pomos e das drupas, sendo rapidamente degradado na pós-colheita.

Tal como Bayley *et al.* (1992) constataram, o fungo *Colletotrichum* penetra nos frutos através da degradação da epiderme, por ação enzimática. Uma das enzimas envolvidas na degradação das paredes celulares pelo fungo é a Poligalacturonase (PG).

Esta enzima atua quebrando as ligações do ácido galacturônico existente nas paredes celulares. Há muito que se conhece o efeito que o cálcio tem no reforço das paredes celulares tornando o ácido galacturônico menos acessível à ação enzimática (Conway *et al.*, 1988). Segundo Park *et al.* (2006) observou-se em maçã, que a existência de mais cálcio na parede celular reduziu a atividade enzimática da PG do fungo, em comparação com os frutos onde não tinha sido aplicado cálcio em pós colheita, também no presente trabalho foi observado que a aplicação de cálcio aos frutos reduziu consideravelmente o número de frutos sintomáticos, na tabela 7 pode-se observar que em todas as fases, os frutos sem tratamento apresentaram maior número de frutos sintomáticos do que os frutos com aplicação de cálcio, seja na dose normal, seja na dupla. A maior diferença é visível entre os frutos da 2ª fase sem aplicação com 90% de frutos sintomáticos e os frutos da 2ª fase com aplicação de dose dupla, com apenas 20% de frutos sintomáticos (tabela 7).

Também em papaia se verificou que a aplicação de cálcio aos frutos reduziu em 5 dias o aparecimento dos sintomas nos frutos (Ayón-Reyna *et al.*, 2017). Com efeito, quer a estrutura, quer a composição química das paredes celulares são importantes para a maior ou menor resistência que estas oferecem à penetração dos fungos (Engelsdorf *et al.*, 2017).

## 5. Resultados e Discussão

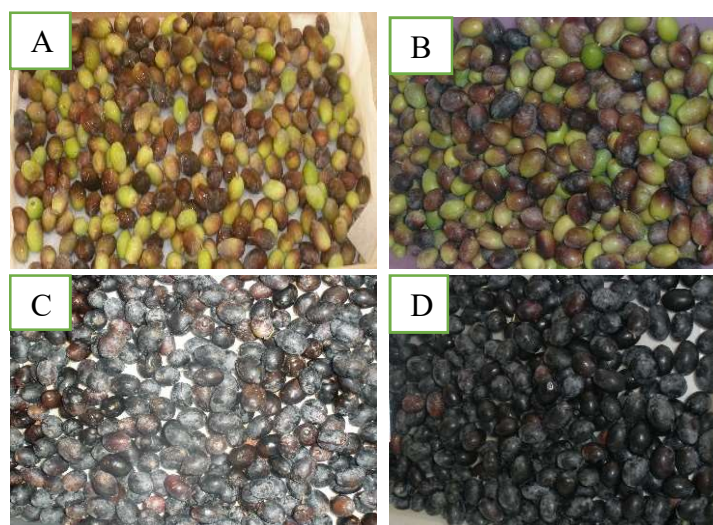
A antracnose da oliveira é conhecida nos países produtores de azeitona e especialmente em Portugal, principalmente nas regiões onde a cultivar 'Galega' tem elevada expressão, já que esta é bastante suscetível à doença (Talhinhas, *et al.*, 2011). Esta patologia vegetal, afeta sobretudo os olivais em anos húmidos e com temperaturas amenas, causando elevados prejuízos (Trapero *et al.*, 2019). Numa abordagem mais ecológica com a tentativa de utilização, de cada vez menor quantidade de fungicidas de sintese química utilizados no controlo da doença, testou-se uma forma alternativa de proteção, utilizando um nutriente.

Neste trabalho testou-se a aplicação do macronutriente secundário, cálcio, como forma de diminuir a entrada de fungos do género *Colletotrichum*. Há muito que se sabe que o cálcio reforça a parede celular da epiderme dos frutos, com um aumento da resistência à degradação, induzida por antracnoses, em particular no armazenamento pós-colheita (Poovaiah, 1988). Incentivados por testes já realizados com outros frutos,

particularmente na maçã, realizaram-se quatro aplicações de cálcio em diferentes doses, como descrito anteriormente. Analisaram-se frutos em 3 diferentes fases de amadurecimento, procurando verificar se a aplicação deste nutriente influenciaria o número de frutos sintomáticos, tanto nas diferentes doses de cálcio aplicadas (controlo, normal e dupla) como nos diferentes períodos de maturação do fruto. Paralelamente foram utilizados frutos das mesmas amostragens para a realização de testes por espectrofotometria de absorção atómica, numa análise aos seus teores de cálcio, presentes nas paredes celulares (AIR).

### 5.1 Detecção de formas latentes

Dos 110 frutos testados por cada tratamento, na fase definida como a fase 0, não foi observada sintomatologia sugestiva de antracnose (figura 23a). As observações foram realizadas com intervalos de 8 dias, até um máximo de 3 semanas. Estes resultados permitiram constatar que não havia formas latentes, presente nos frutos, podendo-se assim realizar as inoculações das fases 1, 2 e 3. Tal como outros autores verificaram a eficiência de desinfeção dos frutos (Moral *et al.*, 2009) neste trabalho também se verificou que após esta, se observou a inexistência de infeção, por formas latentes que pudessem estar no interior dos frutos tal como observado por Materatski *et al.* (2018). Assim seria possível afirmar que as infeções que surgissem posteriormente nos tratamentos em estudo seriam apenas resultantes das infeções induzidas experimentalmente.



**Figura 23 - Aspeto da transição de cores, fase 0 (A); 1 (B); 2 (C) e 3 (D)**  
A-Fase 0; B-Início Maturação; C-Frutos Violáceos; D-Frutos Negros.

## 5.2 Inoculação dos frutos provenientes dos vários tratamentos

De cada uma das fases amostradas (1<sup>a</sup>; 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup>) foram recolhidos em cada uma delas e por cada tratamento, 300 frutos, que foram divididos em 5 grupos de 60 frutos cada uma, perfazendo 15 grupos de cada fase, (Controlo (5 grupos de 60 frutos); Dose Normal (5 grupos de 60 frutos) e Dose Dupla (5 grupos de 60 frutos) 900 frutos por tratamento) tendo posteriormente sido todos eles inoculados com a suspensão de *Colletotrichum nymphaeae*, e mantidos em condições de humidade e temperatura controlados seguindo o protocolo de Sharma (2014).

Após inoculação dos frutos de todas as repetições e de todas as fases estes foram observados aos 8, 10, 15, 20 e 24 dias, com o objetivo de identificar o número de frutos com sintomas de antracnose.

Após as inoculações das diferentes fases e considerando que as inoculações foram realizadas em cada data de colheita (*vide* tabela 5), as observações foram iniciadas 8 dias após inoculação tendo sido repetidas aos 10, 15, 20 e 24 dias. Do total de observações, foi possível chegar aos resultados apresentados, na tabela 7 e, no gráfico da figura 24.

Após 8 dias de inoculação observou-se que todos os tratamentos ou fases apresentavam valores de número de frutos sintomáticos, que variavam entre 0 e 1%. Na 1<sup>a</sup> fase do tratamento, controlo ou sem tratamento, observou-se 1% dos frutos sintomáticos em comparação com 0% de sintomatologia na 1<sup>a</sup> fase do tratamento da dose normal e dupla. Na 2<sup>a</sup> fase do tratamento controlo observou-se 0,6% de frutos sintomáticos, enquanto no tratamento da dose normal, foi de 1%, contra 0% do tratamento da dose dupla. Na 3<sup>a</sup> fase do tratamento controlo a percentagem de frutos sintomáticos foi de 0,6%, no tratamento da dose normal foi de 0%, assim como no tratamento da dose dupla.



Estudo dos efeitos da suplementação em cálcio, na cultivar 'Galega vulgar', para proteção contra a antracnose da azeitona

Tabela 7- Percentagem de frutos sintomáticos aos 8, 10, 15 e 20 dias após inoculação.

Dias pós inoculação	Fases	Controlo S/ Aplicação	Dose Simples 2Kg	Dose Dupla 4Kg
8 dias	1ª Fase	1%	0%	0%
	2ª Fase	0,6%	1%	0%
	3ª Fase	0,6%	0%	0%
10 dias	1ª Fase	1,3%	0,6%	0%
	2ª Fase	2%	2,5%	0,6%
	3ª Fase	4,5%	3,5%	1%
15 dias	1ª Fase	5,8%	5%	3,5%
	2ª Fase	90%	75%	20%
	3ª Fase	100%	98%	90%
20 dias	1ª Fase	27%	26%	15%
	2ª Fase	100%	100%	93%
	3ª Fase	100%	100%	98%

Após 10 dias da inoculação, observaram-se maiores diferenças no número de frutos sintomáticos. É possível observar que o tratamento de dose dupla apresenta valores inferiores de frutos sintomáticos em relação ao tratamento controlo e 1ª fase. Na 1ª fase do tratamento controlo constatou-se que existiram 1,3% de frutos sintomáticos, comparativamente o tratamento dose normal apresentou 0,6% de frutos sintomáticos, enquanto no tratamento da dose dupla foi de 0%. Na 2ª fase do tratamento controlo, a percentagem de frutos sintomáticos foi de 2%, comparativamente o tratamento da dose normal apresentou 2,5% de frutos sintomáticos, enquanto no tratamento da dose dupla foi de 0,6%. Na 3ª fase do tratamento controlo foram observados 4,5% de frutos sintomáticos, no tratamento da dose normal de 3,5% e no tratamento da dose dupla de 1%.

Aos 15 dias após inoculação foi realizada nova observação aos frutos, podendo novamente observar-se diferenças entre os diversos tratamentos e modalidades. O tratamento controlo mostrou que só na amostra correspondente à 1ª fase se obtiveram números de frutos sintomáticos com valores baixos, 5,8%, comparativamente com o tratamento dose normal, que foi de 5% e no tratamento dose dupla foi de 3,5%. Na 2ª fase esses valores estão perto da totalidade de frutos no tratamento controlo, 90%, enquanto



no tratamento da dose normal foi de 75% e no tratamento da dose dupla só de 20%. Na 3ª fase do tratamento controlo esses valores são a totalidade dos frutos utilizados nessa amostragem, 100% enquanto no tratamento da fase normal foi de 98% e no tratamento da dose dupla de 90%. No tratamento de dose normal existe uma diferença, para menor número de frutos sintomáticos, em particular na 2ª fase em que esse valor é menos 15% em relação ao tratamento controlo. No Tratamento dose dupla observou-se que existiram consideráveis diferenças, entre o número de frutos sintomáticos a que corresponde a percentagem de 3,5% (1ª fase) e 20% (2ª fase), principalmente entre a 1ª e 2ª fase de qualquer um dos outros tratamentos em relação à dose dupla. Na 3ª fase, essa diferença é menor, no entanto ainda existente.

Foi realizada nova observação aos 20 dias, sabendo-se no entanto que a 3ª fase do tratamento controlo e da 1ª fase, não teriam muito mais para evoluir, na nossa contagem. Observou-se que a partir dos 20 dias de inoculação só a 1ª fase de qualquer um dos tratamentos ainda apresentava valores positivos com significado para este estudo, no tratamento controlo apresentavam-se 27% de frutos sintomáticos, no tratamento de dose normal, foi de 26% e no tratamento de dose dupla foi de 15%. Na 2ª e 3ª fase dos tratamentos controlo e dose normal apresentavam-se todos os frutos sintomáticos 100%. Só no tratamento de dose dupla existiam alguns frutos sem sintomatologia, apresentando 93% de frutos sintomáticos na 2ª fase e 98% na 3ª fase.

Realizou-se uma última contagem aos 24 dias, podendo constatar-se que só a 1ª fase apresentava diferença entre os diferentes tratamentos, na 1ª fase do tratamento controlo apresentou 96% de frutos sintomáticos, no tratamento dose normal apresentou 93% de frutos sintomáticos e no tratamento dose dupla, 87% de frutos sintomáticos. Na 2ª e 3ª fase de todos os tratamentos, aos 24 dias não se apresentavam valores com diferenças, sendo que a totalidade (100%) dos frutos se apresentavam sintomáticos, com exceção da 2ª fase do tratamento dose dupla que apresentava 99% de frutos sintomáticos.

### 5.3 Teores de cálcio presentes nas paredes

Os trabalhos que recorrem à aplicação de cálcio aos frutos, com o objetivo de aumentar a sua capacidade de conservação e qualidade, apresentam resultados contraditórios não confirmando a eficácia desta aplicação (Conway *et al.*, 2002). Isto é, o cálcio aplicado aos frutos pode estar presente em diversas frações da célula além da parede celular. Neste trabalho a presença de cálcio na parede celular, após aplicação de cálcio ao fruto, foi confirmada por análises posteriores, efetuadas à parede celular.

A presença de cálcio na fração das paredes celulares não é geralmente avaliada neste tipo de trabalhos e habitualmente os resultados dos níveis deste catião vêm reportados ao peso fresco total do fruto. O cálcio tem importância conhecida na estabilidade das paredes celulares da epiderme dos frutos, fazendo um reforço das ligações das pectinas e dando consistência e resistência à epiderme a fungos e acidantes fisiológicos (Brett e Waldron, 1996). Desta forma o cálcio contribui para o aumento da consistência dos frutos nas paredes celulares porque se liga às pectinas por conseguinte foi necessário perceber-se, se os níveis de cálcio presentes nas paredes aumentavam com a aplicação deste.

A degradação das paredes celulares é um processo normal, ocorrendo durante o amadurecimento dos frutos, consistindo em alterações desde o final do crescimento e desenvolvimento até ao estado inicial de senescência (Watada *et al.*, 1984). A senescência é definida por estes autores como o processo que se segue à maturação fisiológica do fruto, levando à morte dos tecidos. Nos frutos como a azeitona, a laranja, ou as uvas (frutos não climatéricos), mostram uma queda estacionária da atividade respiratória (Eskin, 1990).

Durante o amadurecimento há alterações da biossíntese de pigmentos e produção de compostos voláteis, sendo estes acompanhados pelo amolecimento dos tecidos, de muitos frutos. Este amolecimento corresponde a alterações dos tecidos, ao nível das propriedades mecânicas, que se relacionam diretamente com alterações das paredes celulares durante o processo de amadurecimento (Fischer e Bennett, 1991). A regulação da expansão e da dissolução da parede celular, assim como a modificação da lamela média, durante o amadurecimento, são importantes fatores que afetam a firmeza dos tecidos, contribuindo para a sua degradação, possibilitando a entrada de fungos patogénicos nos frutos, através da epiderme (Fischer e Bennett, 1991). O amolecimento

dos tecidos sugere a clivagem de ligações covalentes que unem as pectinas (Fischer e Bennett, 1991). O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se às pectinas reforçando-as e dando estabilidade às paredes celulares (Brett e Waldron, 1996).

Em comparação com os teores de cálcio encontrados nas paredes celulares das ameixas, que foram entre 2 a 3,1mg Ca/g AIR (Rato A., 2008) podemos observar que os valores presentes na azeitona são superiores (tabela 12), no entanto, não podemos afirmar que se deve a uma maior permeabilidade da parede celular da epiderme da azeitona, em relação à ameixa, porque existem outros parâmetros que teriam que ser equacionados, como o número e a altura das aplicações, a formulação do cálcio aplicado ou o material utilizado para a aplicação.

Da 2ª para a 3ª fase (figura 24) é possível observar uma diminuição dos teores de cálcio presentes nas paredes, em todos os tratamentos (controlo, dose normal e dose dupla) embora no controlo essa diminuição seja maior, sendo estes valores, perfeitamente justificados, uma vez que com o amadurecimento dos frutos ocorre a dissolução e quebra de polissacarídeos da lamela média, assim como das paredes celulares devido à ação duma diversidade de enzimas das paredes celulares (Fischer e Bennett, 1991).

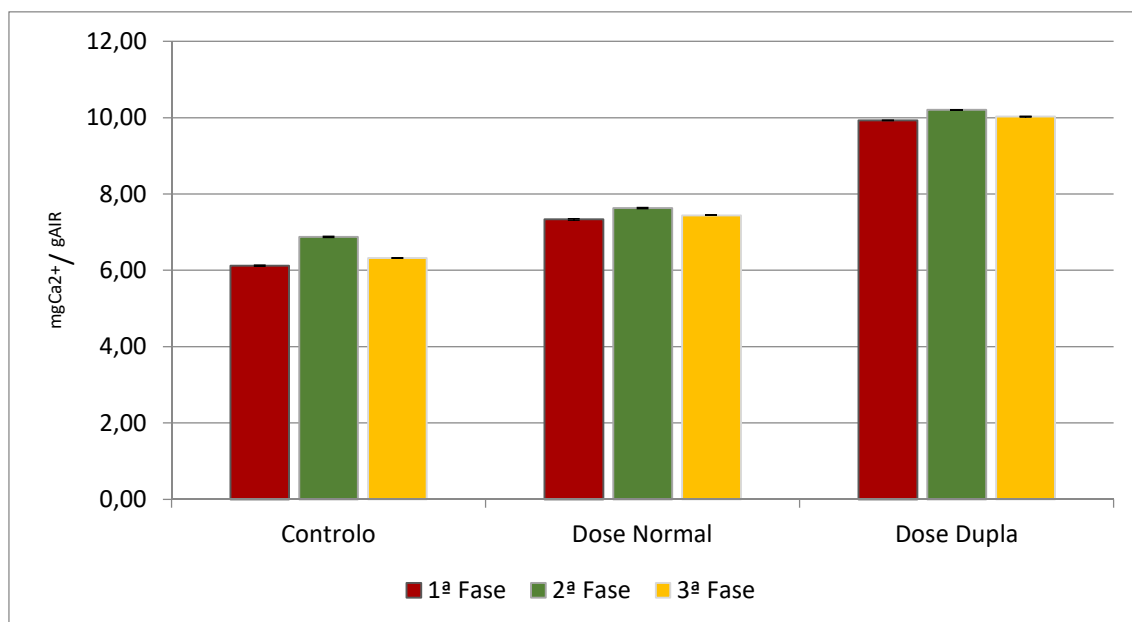


Figura 24 - Teores de cálcio (mg/g AIR) presente nas paredes celulares.

A tabela 12 apresenta os valores correspondentes ao gráfico da figura 24, onde se podem observar os valores do teor de cálcio encontrados nas paredes celulares da epiderme. Todas as aplicações realizadas apresentaram diferentes valores de teores de cálcio presentes na parede celular, assim, constatámos que;

Na fase 1 de maturação os valores variaram entre  $6.12 \pm 0.01$  (mg Ca/g AIR) no controlo a  $9.93 \pm 0.02$  (mg Ca/g AIR) na dose 2.

Na fase 2 de maturação os valores variaram entre  $6.88 \pm 0.01$  (mg Ca/g AIR) no controlo a  $10.21 \pm 0.00$  (mg Ca/g AIR) na dose 2.

Na fase 3 de maturação os valores variaram entre  $6.32 \pm 0.01$  (mg Ca/g AIR) no controlo a  $10.03 \pm 0.02$  (mg Ca/g AIR) na dose 2.

**Tabela 8 - Valores de teores de cálcio mg/g de AIR.**

	<b>Controlo</b>	<b>Dose Normal</b>	<b>Dose Dupla</b>
<b>1ª Fase</b>	6.12	7.33	9.93
<b>2ª Fase</b>	6.88	7.63	10.21
<b>3ª Fase</b>	6.32	7.44	10.03

No presente estudo verificou-se que entre o “tratamento controlo” sem aplicação de cálcio e os outros dois tratamentos com uma aplicação na dose normal e com uma aplicação dupla na dose de cálcio, pode observar-se que existiram diferenças significativas ( $p < 0.0002$ ) entre as 3 fases estudadas, principalmente entre o controlo e a 2ª fase, os valores obtidos em mg de cálcio por g de parede celular, podem observar-se na tabela 12.

## 6. Conclusões

A cutícula das plantas e a parede celular representam as principais barreiras físicas à penetração dos fungos.

Neste trabalho conseguiu-se avaliar qual o efeito das aplicações de cálcio, durante o período de desenvolvimento do mesocarpo e amadurecimento dos frutos, com o objetivo de dificultar a entrada do fungo "*Colletotrichum*" nos frutos da cv. 'Galega vulgar'. Observou-se que a modalidade em que se aplicou a dose dupla, correspondente a 4kg por ha do produto utilizado, foi a mais promissora, já que a sintomatologia apresentada ao fim de 15 dias de inoculação com o fungo era de apenas 20% em relação ao total da amostragem. Esta dose de produto, tendo sido aplicada na fase inicial, com temperaturas bastante elevadas (40°C) não apresentou efeitos de fitotoxicidade, tanto na folha como no fruto, possivelmente devido à formulação do produto. A dificuldade de penetração do fungo na epiderme dos frutos, demonstrada pelas observações e testes laboratoriais, onde se verificou que quanto maior era a dose aplicada de cálcio, maior era o teor deste nas paredes celulares da epiderme e menor percentagem de frutos contaminados, vem confirmar que tal como em estudos nouro tipo de frutos, na azeitona a aplicação faseada de cálcio, durante o ciclo de desenvolvimento do fruto, torna a película mais resistente à entrada de fungos, ficando os frutos protegidos durante um maior período de tempo, principalmente com a aplicação feita na dose dupla.

Nas avaliações ao teor de cálcio nas paredes celulares (AIR), realizadas através de espectrofotometria de absorção atómica, concluímos que sempre que aplicamos cálcio, tanto na dose normal, como na dupla, existiu sempre um aumento deste nas paredes celulares dos frutos, em relação ao nosso controlo, sendo que há diferença significativa entre os resultados.

De ressaltar que neste trabalho só trabalhamos os dados relativos à quantidade de cálcio presente nas paredes celulares e nunca o total, uma vez que este pode encontrar-se no citoplasma ou no vacúolo da célula, não contribuindo desta forma para a estabilidade das paredes celulares, importante para atrasar a entrada do fungo *Colletotrichum* nos frutos.

Não sendo um objetivo deste trabalho, no entanto constatou-se que o cálcio presente nas células da epiderme, não passa para o azeite, mas vai na parte correspondente ao bagaço de azeitona, onde a epiderme do fruto faz parte da constituição deste.

Os fungos causam graves prejuízos a nível mundial, em muitas culturas com interesse alimentar e económico. Até este momento as soluções químicas para o controle de muitos dos fungos que atacam a cultura do olival, passam essencialmente pela utilização de cobre, tendo este a limitação de só controlar o fungo da antracnose, só na fase de infeção, sendo que, quando a infeção esteja instalada, a atuação do cobre é bastante duvidosa. Além do mais, como um produto de contato, apresenta grandes percas por lavagem, quando existe pluviosidade, a seguir às aplicações. Nos últimos tempos têm sido desenvolvidos produtos químicos, tanto nos fungicidas de ação erradicante, como sistémica. No entanto, na generalidade, o uso excessivo destes tem causado poluição do meio ambiente e tem feito desenvolver resistências a vários organismos patogénicos.

Devido a esta situação é urgente pesquisar outras formas de defesa e proteção das plantas, que sejam menos nocivas ao ambiente e saúde humana. Nesse princípio, numa filosofia de contribuir para uma nutrição equilibrada da planta e a utilização de produtos que reforcem a sua imunidade e defesas, este poderá ser um caminho a seguir no presente, de modo a conseguir um equilíbrio mais eficiente entre a produção, o ambiente e o economicamente viável.

Embora não tenha sido objeto de estudo deste trabalho, verificou-se também que nos frutos onde foi aplicado cálcio, constatou-se um menor ataque de mosca da azeitona (*Bactrocera oleae*). A mosca da azeitona é um dos agentes “facilitadores” da entrada de fungos nos frutos, uma vez que após depositar o ovo no fruto, deixa um orifício aberto, constituindo uma porta de entrada.

## **7. Estudos Futuros**

No seguimento deste trabalho será interessante realizar novos estudos com o objetivo de avaliar qual a concentração de cálcio presente nas paredes das células da epiderme dos frutos, separada da quantidade presente na polpa. Neste trabalho pela complexidade e pelo tempo disponível para ser realizado, como trabalho final de mestrado, não foi possível conseguir tais resultados.

No futuro seria interessante, com base no trabalho já realizado, perceber através de ensaios de campo e controlo laboratorial, se a aplicação de cálcio e o seu efeito de reforço das paredes celulares da epiderme, constituem uma prevenção eficaz contra as posturas da mosca da azeitona. Uma vez que neste ensaio, observamos que existiam mais frutos com picadas de mosca, recolhidos nas amostras aleatórias, no nosso tratamento controlo, sendo que a quantidade de frutos picados, decrescia consoante aumentava a dose de cálcio aplicada, respetivamente na dose normal e dose dupla.

## 8. Bibliografia

Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*, 5ª Edition, Department of Plant Pathology, University of Florida, USA, p. 952.

Amaro, P.T. (1997). *Algumas doenças da oliveira*. Direção- Geral de Proteção das Culturas. Lisboa.

Ayón-Reyna, L., López-Valenzuela, J., Delgado-Vargas, F., López-López, M., Molina-Corral, F., Carrillo-López, A., e Vega-García, M. (2017). Effect of the Combination Hot Water - Calcium Chloride on the In Vitro Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and the Postharvest Quality of Infected Papaya. *Plant Pathology Journal*, 33: 572–581.

Azevedo, R. (1976). *A defesa fitossanitária da oliveira em Portugal*. INIA. Oeiras.

Bailey, J.A, Nash C, Morgan, L.W, O'Connell R.J e TeBeest D.O. (1992). Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. *Phytopathology*, 86: 1076-1083.

Bejarano-Alcazar, J., Blanco- Lopez, M., Melero- Vara, J.M. e Jiménez- Diaz, R. (1996). Etiology, importance and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in Southern Spain. *Plant Disease*, 80: 1233- 1238.

Belge, B., Goulão, L., Comabella, E., Graeil, J., Lara, I. (2017). Refrigerated storage and calcium dips of ripe “Celeste” sweet cherry fruit: Combined effects on cell Wall metabolism. *Scientia Horticulturae*, 17: 182-190.

Blok, W.J., Lamers, J.G., Termorshuizen, A.J. e Bollen, G.J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90: 253-259.

Bohm, J., Gouveia, J. (2013). *Preâmbulo. O Grande Livro da Oliveira e do Azeite*. Dinalivro, Lisboa, p. 24-25.



Brackmann, A., Ribeiro, N. D. (1992). Desordens fisiológicas em macieira induzidas por deficiência de cálcio e seu controle. *Ciência Rural*, 22: 247- 253.

Brackmann, A., Mazaro, S., Cecchin, R. (1994). Efeito do pré- resfriamento e tratamento pós colheita sobre a qualidade de maçãs, cv. 'Golden Delicious' e "Fuji", durante o armazenamento em atmosfera normal e controlada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 16: 7- 14.

Brackmann, A., Mazaro, S., Cecchin, R. (1996). Pré- resfriamento e tratamento químico pós- colheita de maçãs cv. "Golden Delicious" e "Fuji". *Ciência Rural*, 26: 185- 189.

Brett, C. T., Waldron, K. W. (1996). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. eBook.

Cacciola, S., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo, G. (2012). Olive Anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, p. 29- 44.

Cacciola, S., Agosteo, G., Faedda, R., Frissullo, S., Di San Lio, G. (2005). Characterization of *Colletotrichum* species causing olive anthracnose in Italy. 2<sup>nd</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group "Integrated Protection of Olive Crops". Italy.

Cantero, F. de A. (1997). *Enfermedades y Plagas del olivo*. 3<sup>a</sup> ed. Riquelme y Vargas Ediciones, S.L.. Jaén, 646p.

Cardoso, J. (1965). *Os Solos de Portugal a Sul do rio Tejo*. Direcção Geral dos Serviços Agrícolas, Lisboa, p.161- 234.

Cardoso, J.M.S., Félix, M.R., Clara, M.I.E., Oliveira, S. (2005). The complete genome, sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L. *Archives of Virology*, 150: 815- 823.

Coimbra, M. A., Delgadillo, I., W., W. K., Selvendran, R. (1996). Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. In "Moderns Methods of Plant Analysis" (H.-F. Linskens and J. F. Jackson). Berlin, v. 17: 19-44.

Colella, C., Miacola, C., Amenduni, M., D'Amico, M., Buici, G., Cirulli, M. (2005). Host-derived resistance for biological control of *Verticillium* wilt of olive. *2<sup>nd</sup> European Meeting of the IOBC/ WPRS Study Group "Integrated Protection of Olive Crops"*. Florence, Italy.

Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1545-1562.

Conway, W. S., Sams, C. E. e Hickey, K. D. (2002). Pre-and Postharvest calcium treatment of apple fruit and its effect on quality. *Acta Horticultur*, 594: 413- 419.

Conway, W. S., Sams, C. E. e Kelman, A. (1994). Enhancing the natural resistance of plant tissues to postharvest diseases through calcium applications. *Hortscience*, 29: 751-754.

Cordeiro, A. (2016). Índice de maturação da variedade "Galega". *Revista Vida Rural*, 1817: 34-35.

Del Moral, J. e Medina, D. (1985). El "repilo plumizo" del olivo causado por *Cercospora cladosporioides* Sacc., enfermedad presente en España. *Bolín de sanidade vegetal*. 11: 31-36.

Diéguez, U.J., Forster, H., Soto- Estrada, A. e Adaskaveg, J. (2005). Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology*, 95: 751-758.

Engelsdorf, T., Will, C., Hofmann, J., Schmitt, C., Merritt, B., Rieger, L., Frenger, M., Marschall, A., Franke, R., Pattathil, S., Vool, L. (2017). Cell wall composition and penetration resistance against the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* are affected by impaired starch turnover in *Arabidopsis* mutants. *Journal of Experimental Botany*, v. 68.

Eskin, N.A. (1990). Biochemistry of foods 2nd edition. *Science direct*, 27: 319- 330.

Ferguson, I. B. e Drobak, B. K. (1988). Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *HortScience*, 23: 262-266.

Ferguson, I.B., Watkins, C.B. (1989). Bitter-pit in apple fruit. *Horticultural Reviews*, New York, 11: 289-355.

Félix, M., Clara, M. (2007). *Os Vírus*. In: *Manual de Proteção Integrada do Olival*. Torres, L. João Azevedo Editor, p. 275-296.

Félix, M.R., Clara, M.I., Leitão, F. e Serrano, J. (2002). Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. *Acta Horticulturae*, 586: 721-724.

Figuerola, C., Opazo, M., Vera, P., Arriagada, O., Díaz, M., Moya-león, M. (2012). Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell Wall composition and expression of cell Wall- modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit. *Elsevier Journal*, p. 132.

Fischer, R. L. e Bennett, A. B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. PlantPhysiol*, 42: 675-703.

García, A. (2003). *Nueva Olivicultura*. Editorial Mundiprensa. Madrid, p.234.

García, A. (2005). *O Cultivo Moderno do Olival*. Publicações Europa- América, Mem Martins, p. 296.

Garcia, F. (1991). “Repilos” del olivo: ataque en fruto. *Phytoma-España*, 25:31 -36.

Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghrrah, M., Grimont, F. e Grimont, P.A.D. (1992). DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp.savastanoi Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp.nov. *International Journal of systematic Bacteriology*, 42: 606-612.

Gouveia, J., Saldanha, J., Saldanha, J.L., Martins, A., Modesto, M., Sobral, V. (2002). *O azeite em Portugal*. Edições Inapa, Lisboa, p. 240.

Google Earth. (2017) [www.google.com](http://www.google.com)

GPP. Dados agrícolas 2017. Lisboa

Graniti A., Frisullo S., Penissi A., Magnano L. (1993). Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPPO Bull*, 23: 457-465.

Henriques, M.I.C. (1994). Virus diseases of olive: na overlook. *Acta Horticulturae*, 356: 379-385.

Henriques, M.I.C., Leitão, F., Potes, M., F. e Serrano, J. (1990). Virus detectados em *Olea europaea* L. *Resumos do I Congresso Ibérico de Ciências Hortrícolas*. Lisboa, nº 245.

INE (2017). Estatísticas Agrícolas 2016. Lisboa.

Iuchi, V. L., *et al.* (2001). Distúrbios fisiológicos e desequilíbrios nutricionais em macieira. *Ciência Rural*. Florianópolis. v.40.

Jiménez-Díaz, R.M. (1997). Importancia y perspectivas de control de la verticilosis del olivar. *Phytoma-España*, 88: 14-26.

Jiménez-Díaz, R.M. (1998). La verticilosis (*Verticillium dahliae*) del olivo: Biología y epidemiología. Nuevas perspectivas para el control de la verticilosis. *Phytoma- España*, 102: 142-148.

Johnson, W.S., Manderkic, J., Morris, R. e Mills, L. (s/d). *Management of Verticillium wilt of olive*.

Kelley, K., Ashworth, L. e Sibbett, G.S. (1983). *Solarization- A tool for Verticillium Wilt Control in Orchards*, <http://uric.ucdavis.edu/veginfo>.

Leitão, F., Potes, M., Calado, M. e Almeida, F. (1986). *Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal*. MADA- Direcção Geral de Planeamento e Agricultura. Lisboa, p.17-104.

Llor, X., Pons, E., Roca, A., Alvarez, M., Mañé, J., Fernández-Bañares, F., Gassull, M.A. (2003). The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Elsevier*, p. 71-9.

López- López, A., Bautista- Gallego, J., Moreno- Baquero, J.M., Garrido- Fernández, A. (2016). Data on green Spanish- style Manzanilla table olives fermented in salt mixtures. Elsevier. *Science Direct*, 8: 709-716.

López- Villalta, M.C. (1999). Olive pest and disease management. *International Olive Oil Council*, Madrid, p. 207.

Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L. e Surico, G. (2005). Spread of levan- positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, the causal agente of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 101-112.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. *Elsevier Science Publishing*, v.78.

Martín, M. P., Garcia- Figueres, F. e Trapero, A. (2002). Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Grasas e Aceites*, v. 65.

Mateo-Sagasta, E. (1968). Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (*Deuteromiceto Melanconial*). *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agriculture*, 30: 31-135.

Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A., Campos, M., Rei, F. e Félix, M. (2018). Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Olive Anthracnose and New Perspectives on Controlling the Disease in Portugal. *Journal Agronomy*, v. 301.

Mercado- Blanco, J., Rodriguez- Jurado, D., Pérez- Artes, E. e Jiménez- Diaz., R.M. (2002). Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infection olive plants by nested PCR. *European Journal of plant Pathology*, p. 1-13.

Moral, J.; Oliveira, R.; Trapero, A. (2009). Elucidation of the Disease Cycle of Olive Anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, p. 548-56.

Mosca, S., Li, D., Nicosia, M., Cacciola, S., Schena, L. (2014). Molecular analysis of colletotrichum species in the carposphere and phyllosphere of olive. PLoS ONE 9(12): e114031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114031>

Natale, W., *et al.*, (2009). Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular dos frutos de goiabeira. *Brasília*, 40: 1239-1242.

Navero, D. B., Cimato, A., Fiorino, P., Romero, L. R., Touzani, A. Castañeda, C., Serafini, F. e Navas, I. T. (2000). *Catálogo Mundial De Variedades De Olivo*. Ed. Concelho Oleícola Internacional, p. 360.

Oliveira, R. e Trapero, A. (2001). Effect of temperature on species of *Colletotrichum* causing olive anthracnose. *11<sup>th</sup> Congresso of the Mediterranean Phytopathological Union na 3<sup>rd</sup> Congresso f the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. Évora.

Ortiz, A., Graell, J., Lara, I. (2011). Preharvest calcium applications inhibit some cell wall-modifying enzyme activities and delay cell wall disassembly at commercial harvest of 'Fuji Kiku-8 apples. *Postharvest Biology and Technology*, 62:161-167.

Pacini, E. e Cresti, M. (1977). Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta*, 173: 1-4.

Park, E., Solomos, T., McEvoy, J., Conway, W., Sams, C. (2006). The effect of calcium on the expression of polygalacturonase activity by *Colletotrichum acutatum* in apple fruit. *Plant Pathology Journal*, 5: 183-190.

Peñalver, R., Garcia, A., Ferrer, A. e López, M.M. (1998). La tuberculosis del olivo: Diagnóstico, epidemiología y control. 9º Symposium- La sanidade del olivar en Países del Mediterráneo. *Phytoma España*, 102: 177-179.

Pereira, P. (2014). *Xylella fastidiosa*, *Boletim Técnico*, INIAV, Lisboa.

Pérez- Artés, E., Mercado- Blanco, J., Ruz- Carrillo, A., Rodriguez- Jurado, D. e Jiménez- Diaz, R. M. (2005). Detection of the defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR. *Plant and Soil*, 268: 349-356.

Pérez, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E. e Correl, J. C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0784>.

Pooaiaha, B. W. (1986). Role of calcium in prolonging storage life of fruit and vegetables. *Food Technology*, 16: 86-89.

Pooaiaha, B. W. (1988). Molecular cellular aspects of calcium action in plants. *HortScience*, 2: 267- 271.

Ranjbar, Shiva, Rahemi, Majid; Ramezani, Asghar (2018). Comparison of nano-calcium and calcium chloride spray on postharvest quality and cell wall enzymes activity in apple cv. Red Delicious. *Scientia Horticulturae*, v. 240.

Rato, A. (2009). *Comportamento pós- colheita da "Ameixa Rainha Cláudia Verde"*. Évora. BGUE- Colégio da Mitra, 169424: 162.

Rato, A. (2008). *Comportamento pós-colheita da ameixa 'Rainha Cláudia Verde' Prunus domestica L. – Efeitos do cálcio na maturação*. Repositório da Universidade de Évora. Évora.

Ribeiro, D., Vilela, L.A. (2007). *Macro e Micro Nutrientes, Faculdades Integradas de Mineiros. Instituto de Ciências Agrárias*. Brasil.

Rodrigues, F. M. (2014). *Apontamentos de Olivicultura*. ESAE, Elvas.

Rodríguez- Jurado, D. Blanco- Lopez, M.A., Rapoport, H.F. e Jiménez-Díaz, R.M. (1993). *Present status of Verticillium wilt of olive in Andalusia (Spain)*.

Selectis. Doenças da oliveira. [www.selectis.pt](http://www.selectis.pt) .

Serra, C. (2017). *Xylella fastidiosa Informação sobre a bactéria e seus vectores*. DGAV.

Sharma, M., Kulshrestha, S. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: Na Anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12:1233-1246.

Snowdon, A.L. (1991). *A colour atlas of post-harvest diseases e disorders of fruit e vegetables*. vol.1. Wolfe Scientific Ltd., England, 302p.

Sousa, A., Pereira, J.A. Casal, S., Oliveira, B. e Bento, A. (2005). *Effect of the olive fruit fly and the olive anthracnose on oil quality of some Portuguese cultivars*. 2<sup>nd</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group “*Integrated Protection of Olive Crops*”. Florence, Italy, v. 30.

Stone, A. (s/d). *Soil and cropping systems management and plant health*.

Talhinhas P, Gonçalves E, Sreenivasaprasad S and Oliveira, H. (2015). Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *Eur J. Plant Pathol*, 142: 73-83.

Talhinhas, P., Mota- Capitão, C., Martins, S., Ramos, A., Neves- Martins, J., Guerra- Guimarães, L., Oliveira, H. (2011). Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *PlantPathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02397.x>

Talhinhas P, Neves-Martins J, Oliveira H, Sreenivasaprasad S. (2009). The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hot spot. *FEMS Microb. Lett*, 296: 31-38.



Talhinhas P, Ferreira, P., Neves-Martins J, Sreenivasaprasad S, e Oliveira H. (2003). *Colletotrichum acutatum*: Principal agente causal da gafa da oliveira em Portugal. III Simpósio Nacional de Olivicultura, Castelo Branco, p. 29- 31.

Talhinhas, P.; *et al.* (2011). Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology*, 60: 483–495.

Therios, I. (2009). *Olive*. UK: Biddles Ltd, King's Lynn.

Tobias, R. *et al.* (1992). *Cell Wall composition of calcium- treated apples inoculated with botrytis cinérea*. FAO, USA.

Todolivo (2010). *Olival em Sebe*. Córdoba, España.

Trapero, A., Blanco, M. A. D. Barranco, R. Fernández Escobar, L. Rallo, (2008). *Enfermedades*. In: *El cultivo de olivo*. Coedición Junta de Andalucía / Mundi-Prensa, Madrid, p. 595-656.

Trapero, A., Blanco, M.A. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. e Rallo, L. (2004). *Enfermedades*. *El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, p. 557-614.

Trapero, A, Blanco, M. (2008). *Enfermedades*. *El Cultivo del Olivo*. Coedición Mundi-Prensa; Junta de Andalucía, p.225- 266.

Trapero, A. (s/ d). *Los “repilos” del olivo*, <http://www.agrinformacion>.

Trapero, A., López Doncel, L. M., Viruega, J. R. (1998). *Los “repilos” del olivo: etiología, epidemiología y estrategias de control*. 9º Symposium- La sanidade del olivar en Países del Mediterráneo. España, 102: 154-158.

Trapero A, Roca L.F, Moral J. (2009). Perspectivas futuras del control químico de las enfermedades del olivo. *Phytoma España*, 212:80-82.

Trapero, A. e Roca, L. F. (2004). *Bases epidemiológicas para el control integrado de los "Repillos" del olivo*. 15º Symposium Internacional, Valência. España, 164: 130- 137.

Tucker, G. A. (1993). *Respiration and energy*. In "Biochemistry of fruit ripening" (G. B. Seymour, J. E. Taylor and G. A. Tucker, eds.). Chapman e Hall, London.

Verissimo d'Almeida, M. (1899). *La Gaffa des olives en Portugal*, 165: 1545-1562.

Vossen, P. (2004). *Peacock spot and cercospora foliar disease on olive*, [http:// ucce.ucdavis.edu/files/filelibrary/1650/18953.pdf](http://ucce.ucdavis.edu/files/filelibrary/1650/18953.pdf).

Watada, A.E., Herner, R.C., Kader, A.A., Romani, R.J., Staby, G.L. (1984). Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience*, 19: 20-21.

Wilhelm, S. e Taylor, J.B. (1965). Controlo f *Verticillium* wilt of olive through natural recovery and resistance. *Phytopathology*, 55: 310-316.

Xiao, C.L., Subbarao, K.V., Schulbach, K.F. eKoike, S.T. (1998). Effects of crop rotation and irrigation on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and wilt in cauliflower. *Phytopathology*, 88: 1046-1055.

Young, J.M. (2004). Olive knot and its pathogens. *Australian Plant Pathology*, 33: 33-39.