

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Olivicultura e Azeite

Dissertação

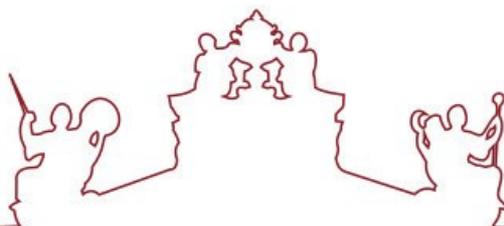
Efeito da suplementação em cálcio ao nível das paredes celulares em três cultivares de oliveira no controle da antracnose

Diogo Miguel Marujo Alves

Orientadores | Professora Maria do Rosário Félix
Professor Renato Ruas Coelho

Évora 2021





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Olivicultura e Azeite

Dissertação

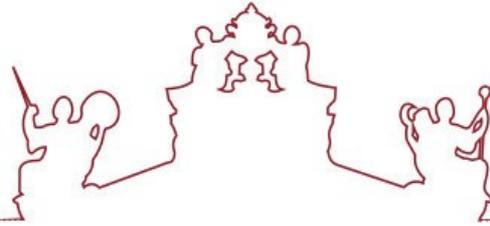
Efeito da suplementação em cálcio ao nível das paredes celulares em três cultivares de oliveira no controle da antracnose

Diogo Miguel Marujo Alves

Orientadores | Professora Maria do Rosário Félix
Professor Renato Ruas Coelho

Évora 2021





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 Maria Teresa Barradas de Magalhães Carvalho (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)) (Arguente)
- Vogal Renato Ruas Coelho (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores. À Professora Doutora Maria Rosário Félix e ao Professor Doutor Renato Coelho pela disponibilidade concebida para a realização deste trabalho, pelo incentivo, persistência, prontidão, pelo conhecimento transmitido e todo o carinho e amizade durante a elaboração da dissertação.

À Professora Doutora Ana Elisa Rato por toda a ajuda, disponibilidade, incentivo, persistência, a enorme dedicação, pelo conhecimento transmitido e por todo o carinho e amizade durante a elaboração da dissertação.

Aos meus pais, tia e restante família pela paciência, compreensão, amor e por estarem presentes incondicionalmente em terminar este ciclo.

À Beatriz Cruz, pela paciência, incentivo, dedicação, amor e por estar sempre presente em todos os momentos.

Ao João, Miguel, Inês, Daniela e Beatriz pela ajuda na recolha e execução das amostras em laboratório.

Ao técnico Vítor Tavares do Laboratório Químico-Agrícola da Universidade de Évora da herdade da mitra pela disponibilidade em ler as amostras.

À Engenheira Teresa Carvalho do INIAV por disponibilizar o ensaio na estação de melhoramento de plantas em Elvas e por toda ajuda nas inoculações dos frutos.

À Gabriela Murta pela ajuda na extração das paredes celulares dos frutos.

Publicações originais dos resultados referentes na tese

Alves, D., Murta, G., Coelho, R., Carvalho, M. T., Farinha, D., Mendes, B., Félix, R., & Rato, A. E. (2021). "*A aplicação de cálcio por via foliar como estratégia sustentável para o controle da antracnose da oliveira*". Resumo apresentado ao, IX Simpósio Nacional de Olivicultura INIAV- Oeiras (Outubro 2021).

Resumo

A oliveira é uma cultura sujeita ao ataque de várias doenças, sendo uma das mais importantes a antracnose, uma vez que pode afetar a totalidade da produção e causar depreciação do azeite pela presença de frutos contaminados. Com a limitação crescente no uso de fungicidas, a busca de métodos alternativos para o controle de algumas doenças tem sido uma prioridade. Neste trabalho avaliou-se, em três cultivares ('Galega vulgar', 'Cobrançosa', 'Picual') o efeito que a aplicação de cálcio origina ao nível das paredes celulares dos frutos, no aumento da resistência epidérmica dos mesmos, de maneira a atrasar ou evitar a contaminação pela antracnose por fungos do género *Colletotrichum*. Os efeitos da aplicação de cálcio foram mais evidentes na cultivar Galega vulgar que apresentou menor percentagem de frutos sintomáticos, bem como uma maior presença de cálcio nas paredes celulares resultante da aplicação foliar, em comparação com as outras variedades.

Palavras-chave – Oliveira; Cálcio; Antracnose; Adubação Foliar; Paredes celulares;

Effect of calcium foliar fertilization in cell walls of three olive cultivars in the anthracnose control

Abstract

The olive tree is susceptible to many infectious diseases caused by fungus. One of the most important diseases is Anthracnose, affecting, in certain years, the entire tree production. Affected fruits will cause degradation and, consequently, alter the organoleptic characteristics of the oils. The search for more sustainable production systems and the minor use fungicides leads to the search of alternative methods for disease control. In this work, it was evaluated, in ('Galega vulgar', 'Cobrançosa', 'Picual') the effect of the calcium application to the fruits, in the resistance of the fruit cell walls in order to delay or avoid the fruit contamination by fungus of the *Colletotrichum* genus (Anthracnose). The effects of calcium application were more evident in the 'Galega vulgar' cultivar, which presented a lower percentage of symptomatic fruits, as well as a greater presence of calcium in the cell walls resulting from foliar application, compared to the other varieties.

Keywords – Olive tree; Calcium; Cell walls; Anthracnose; Foliar Fertilization

Lista de Abreviaturas/Acrónimos

AIR: Resíduo insolúvel em álcool (Paredes celulares)

°C: Graus Célsius

Ca²⁺: Cálcio (Ião)

CDTA: Ácido ciclohexanodiaminotetracético

COI: Conselho Oleícola Internacional

INE: Instituto Nacional de Estatística

INIAV: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

HDL: High Density Lipoprotein

LDL: Low Density Lipoprotein

MED: Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento

Índice

Agradecimentos	i
Publicações originais dos resultados referentes na tese.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas/Acrónimos	v
Índice	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas	x
1. Introdução.....	1
2. Objetivo	3
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1. O cultivo da oliveira.....	4
3.1.1. A origem e importância da cultura da oliveira	4
3.1.2. Caracterização morfológica da oliveira.....	5
3.1.3. Clima.....	6
3.1.4. Solo	7
3.1.5. Cultivares	7
3.1.6. Sistemas de condução	9
3.1.7. Antracnose da oliveira (<i>Colletotrichum</i> spp.).....	13
3.2. A importância do cálcio nas plantas	20
3.2.1. O cálcio como nutriente.....	20
3.2.2. O cálcio e as paredes celulares	21
3.2.3. Aplicação de cálcio às plantas	24
4. Materiais e Métodos	26
4.1. Localização, solo e clima	26
4.2. Caracterização do material vegetal	27
4.2.1. Descrição do ensaio e colheita de amostras.....	27
4.2.2. Colheitas do material vegetal.....	31
4.2.3. Pesquisa de formas latentes de fungos nos frutos.....	31
4.2.4. Inoculação das três variedades com um isolado de <i>C. acutatum</i>	33

4.3. Análises efetuadas ao material vegetal	35
4.3.1. Extração das paredes celulares das folhas	35
4.3.2. Extração das paredes celulares dos frutos.....	35
4.3.3. Análise do teor de cálcio presente no material vegetal.....	36
4.3.4. Determinação da área foliar.....	38
4.4. Análise estatística.....	38
5. Resultados e Discussão.....	39
5.1. Detecção das formas latentes.....	39
5.2. Resultados da inoculação dos frutos das três variedades.....	40
5.3. Teores de cálcio presentes no AIR.....	42
6. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	48
Bibliografia	50
Anexos	60

Índice de Figuras

Figura 1 – Distribuição da oliveira na bacia do mar mediterrânico (Fonte: Oteros, 2014).	5
Figura 2 – Taxonomia e classificação da oliveira (Fonte: Jorge Bhom, 2013).	6
Figura 3 – Olival tradicional (Adaptado da Wilder, 2016).	10
Figura 4 – Olival intensivo- Estação de melhoramento de plantas em Elvas (foto do autor).	11
Figura 5 – Olival super-intensivo na Herdade Torre de Figueiras (foto do autor).	12
Figura 6 – Fruto visto á lupa com sintomas típicos de antracose. Amplicação 40× (foto do autor).	13
Figura 7 – Azeitona mumificada com massa de esporos (Fonte: OliVera, 2020).	14
Figura 8 – Ciclo de vida de <i>Colleotrichum</i> spp. (Adaptado de Agrios, 2005).	16
Figura 9 – Processo de infeção dos conídios na epiderme da azeitona (Adaptado de Bailey et al., 1992).	17
Figura 10 – Esquemática da parede celular vegetal (Adaptado de Villarreal, 2007).	22
Figura 11 – INIAV – Departamento de Olivicultura (Campo de pés mãe). (Fonte: www.googleearth.com).	26
Figura 12 – Gráfico termopluiométrico de 30 anos (1971-2000) da pluviosidade e das temperaturas mínimas e máximas (Estação meteorológica da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas).	27
Figura 13 – Olival intensivo do ensaio - 2x5 m.	28
Figura 14 – Esquema do ensaio dos tratamentos efetuados e origem das amostras recolhidas.	30
Figura 15 – Incubação das variedades em caixas de plástico.	32
Figura 16 – Frutos desinfetados com hipoclorito de sódio.	32
Figura 17 – Placa de Petri com o isolado de <i>Colletotrichum acutatum</i> em cultura pura.	33
Figura 18 – Metodologia para incubação e inoculação de <i>Colletotrichum</i>	34
Figura 19 – Resíduo insolúvel em álcool (AIR): paredes celulares das folhas.	35
Figura 20 – Resíduo insolúvel em álcool (AIR): paredes celulares dos frutos.	36
Figura 21 – Processo da digestão ácida dos frutos e folhas.	37
Figura 22 – Observação de infeções latentes	40

Figura 23 – Número de frutos infetados por dose e variedade ao fim de 12 dias (Representação gráfica de intervalos calculados com 95% de confiança para as médias dos grupos avaliados com N=3).	41
Figura 24 – Miligramas (mg) de cálcio por grama (g) de parede celular dos frutos nas diferentes variedades e tratamentos (Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes segundo o teste de Tukey com $p \leq 0,05$ e N=3).....	43
Figura 25 – Área específica foliar das três cultivares (Representação gráfica de intervalos calculados com 95% de confiança para as médias dos grupos avaliados com N=3).	44
Figura 26 – Rendimento das paredes celulares (g de AIR/100 g de peso fresco): A) entre variedades; B) entre tratamentos (Representação gráfica de intervalos calculados com 95% de confiança para as médias dos grupos avaliados com N=3).....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Datas das aplicações de cálcio.	29
Tabela 2 – Miligrama (mg) de cálcio por grama (g) de parede celular na polpa da azeitona da cultivar Galega vulgar em amostras colhidas em 3 datas (Caeiro, 2020).....	45

1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie ancestral e o seu cultivo remonta à antiguidade. É uma espécie que está otimamente adaptada ao clima mediterrânico e o seu cultivo encontra-se distribuído no mundo em países com estas características climáticas. Na atualidade e a nível mundial, cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica, sendo que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia, Portugal, Chipre, Croácia, Eslovénia e Malta) são responsáveis por 64% da produção mundial (Casa do Azeite, 2020). Em Portugal, estende-se por 377 mil hectares, todos no continente, sendo a esmagadora maioria 372 mil hectares destinados à produção de azeitona para azeite (INE, 2020). O Alentejo é a região olivícola com maior área de olival, com cerca de 205 mil hectares direcionados para a produção de azeite (INE, 2020).

Para que a produção de azeitona seja competitiva e rentável ter-se-á que ter em conta vários fatores, sendo a fitossanidade um dos fatores mais limitantes. Dentro de todas as doenças e pragas que afetam o olival, a antracnose da oliveira, é uma das doenças que mais afeta a produção, pelo seu ataque direto aos frutos, principalmente na altura da maturação, mas também porque afeta a árvore provocando desfoliação e morte dos ramos afetados. Esta doença pode ser provocada por dois complexos de espécies de fungos pertencentes ao género *Colletotrichum*, o complexo *Colletotrichum acutatum* sensu lato (s.l.) e o complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (s.l.) (Sreenivasaprasad & Talhinhos, 2005); Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012). Em Portugal, com cerca de 97%, o complexo hegemónico é o *acutatum* (Talhinhos *et al.*, 2003).

Os sintomas mais graves desta doença são visíveis principalmente nos frutos na fase de maturação, sendo visíveis no outono, e caracterizam-se por lesões enegrecidas, geralmente em depressão, com produção abundante de massas mucilaginosas de esporos de cor laranja caracterizados por acérvulos (Graniti *et al.*, 1993; Amaro, 1997)

O aumento da gravidade da doença, varia com as condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, humidade relativa elevada e presença de chuva, grau de suscetibilidade da variedade e a virulência do agente patogénico, é ainda evidente o aumento da suscetibilidade do fruto à doença, à medida que a maturação do fruto aumenta (Caciola *et al.*, 2012). À medida que decorre a maturação, aumenta a possibilidade do rompimento da epiderme e a degradação das paredes celulares dos frutos e com isso, o aumento da suscetibilidade à infeção do *Colletotrichum* spp. Como consequência desta

doença, o azeite produzido a partir de azeitonas infetadas, apresenta fraca qualidade devido ao aumento da acidez, dos valores de peróxidos, à diminuição da estabilidade oxidativa e dos compostos fenólicos (Carvalho *et al.*, 2008).

Sabendo-se que a degradação da parede celular é um dos principais motivos para a maior ou menor facilidade da entrada de agentes patogénicos para o interior dos tecidos vegetais (Agrios, 1998), a sua frágil constituição, muitas vezes provocada por uma deficiência em cálcio poderá ocasionar maior facilidade da degradação dessa parede celular.

A deterioração das paredes celulares do fruto, para a grande maioria das espécies, ocorre como um processo normal e natural associado à maturação e contribui para a perda de firmeza dos tecidos (Rato, 2009).

O cálcio é um constituinte indispensável da parede celular (Poovaiah 1998), possibilita estabilidade das paredes celulares e a manutenção da permeabilidade seletiva das membranas celulares (Marschner, 1995). Mesmo com teores de cálcio do solo ideais, poderá existir deficiência ao nível de fruto o que pode originar problemas fisiológicos como o “bitter pit” ou o fendilhamento dos frutos. Além da redução dos acidentes fisiológicos, a presença de cálcio nas paredes celulares leva a um aumento da resistência desta estrutura, o que poderá contribuir para uma redução da suscetibilidade das plantas a determinados fungos.

A deficiência de cálcio nos frutos, deve-se à baixa translocação do cálcio no floema, e ao facto da translocação xilémica ocorrer apenas nas fases iniciais de desenvolvimento dos frutos associada às elevadas taxas de transpiração do fruto que ocorrem nesta fase. A carência deste catião poderá ser responsável por uma debilidade na cutícula dos frutos, o que os torna mais suscetíveis à ação de fungos e pragas, originando a sua entrada e posteriormente a sua contaminação (Caeiro, 2020). Desta forma, a suplementação dos frutos em cálcio é efetuada muitas vezes por pulverizações foliares, pois nas fases finais de desenvolvimento dos frutos esta é a forma mais eficaz de aumentar os níveis deste catião nos tecidos. A evidência de que este catião se deposite nas paredes celulares como consequência da sua aplicação aos frutos ainda é duvidosa já que a maioria dos trabalhos se limitam a quantificar o cálcio total presente nos frutos.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar os efeitos da aplicação de cálcio por via foliar, como potenciador da resistência da parede das células dos frutos, utilizando para estudo três cultivares ('Galega Vulgar', 'Cobrançosa', 'Picual'), com diferentes graus de suscetibilidade à antracnose. De modo a relacionar a capacidade de entrada na azeitona pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, efetuaram-se quatro aplicações de formiato de cálcio após o vingamento dos frutos e com intervalos de 15 dias entre si. Tendo sido depois avaliado a taxa de colonização dos frutos pelo fungo e correlacionado estes dados com as quantidades de cálcio presentes nas paredes celulares, analisadas por espectrofotometria de absorção atômica.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. O cultivo da oliveira

3.1.1. A origem e importância da cultura da oliveira

A origem da oliveira, remonta à era terciária o que vai ao encontro da expansão das civilizações do Mediterrâneo, que por séculos governou o destino da humanidade deixando a sua marca na cultura ocidental. Diversos achados arqueológicos identificam este acontecimento a norte do mar morto, na região entre o sul do Cáucaso até aos planaltos do Irão, Palestina e Síria, prologando-se por Chipre até a Anatólia, e da Creta até ao Egito. O cultivo da oliveira, desenvolveu-se substancialmente nestas duas últimas regiões, difundindo-se a partir daí para ilha do Chipre, em direção da Anatólia, para Egito (Rallo, 2005).

A importância do azeite na bacia Mediterrânica, aparece logicamente como um produto alimentar, mas também como combustível, principalmente utilizado como iluminação ou até como um produto utilizado em rituais de adoração. Além do azeite, a azeitona é também consumida em verde, após o processo de conserva, em salmoura por exemplo, atingindo valores consideráveis de consumo na bacia do mediterrâneo (Figura 1) (Caeiro, 2020).

O azeite é hoje reconhecido e recomendado como um produto benéfico para a saúde, devido ao seu elevado teor em ácidos gordos polinsaturados. O ácido oleico também é conhecido como Ómega-9, sendo uma gordura monoinsaturada é muito menos suscetível à deterioração do que outras gorduras. Pode fazer parte da composição do azeite até 85%. O ácido linoleico, também é conhecido como Ómega-6, é uma gordura do tipo polinsaturada. A alteração dos ácidos gordos saturados 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. Pesquisas afirmam, que níveis excessivos de ácidos gordos Ómega-6 podem aumentar a probabilidade de ocorrência de algumas doenças, sendo necessário um equilíbrio entre os dois para de beneficiar das funções (Lor *et al.*, 2003).

Apesar de os países mediterrâneos com maior tradição na cultura da oliveira serem 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 anos a ter uma diminuição significativa na sua área produtiva (Bohm, 2013).

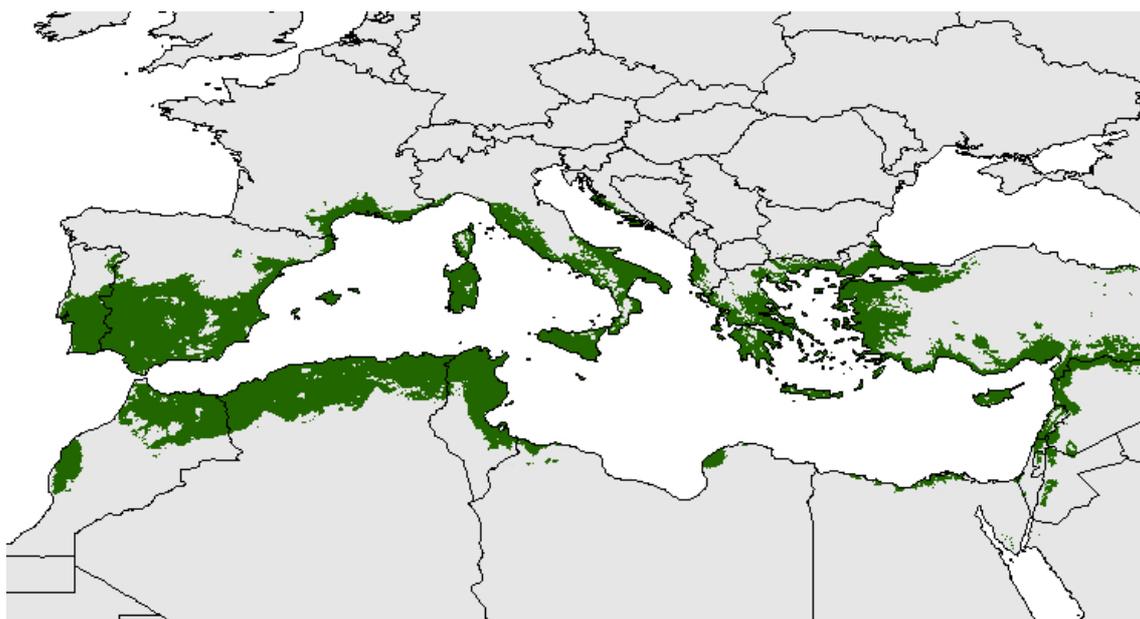


Figura 1 – Distribuição da oliveira na bacia do mar mediterrânico (Fonte: Oteros, 2014).

3.1.2. Caracterização morfológica da oliveira

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), (Figura 2), (Bohm, 2013).

A oliveira origina plantas de porte médio com a 4 a 8 metros de altura, possuindo grande longevidade, copa densa e sistema radicular profundo (Bohm, 2013). Pode permanecer em produção centenas de anos. O tronco é largo e o ritidoma pode variar de cinzento a verde acinzentado. A copa é redonda, ligeiramente lobulada, a sua ramificação natural tende para a produção de uma copa bastante densa. A densidade da copa, a cor da madeira, porte, e a distância entre nós, varia muito com a cultivar. (Cabral, 2009). As condições ambientais e agronómicas durante o crescimento e, em particular, a poda, influenciam a forma da árvore (Rallo, 1999).

As folhas da oliveira são persistentes, e em condições normais sobrevivem dois ou três anos. São simples, inteiras, geralmente lanceoladas e com o pecíolo curto, apresentando coloração na página superior e inferior (Garcia, 2005). O limbo tem entre 3 e 9 cm de comprimento, e a largura pode variar entre 1 e 1,8 cm. A nervura central é muito marcada e as secundárias pouco aparentes (Cabral, 2009). As folhas são opostas e entrecruzadas (Rallo, 1999).

As flores agrupam-se em inflorescências, do tipo panícula, formando-se nas axilas das folhas dos nós dos ramos do ano anterior. Apresentam também, flores perfeitas (hermafroditas) e estaminíferas (masculinas) podendo a proporção entre as duas ser variável. São compostas por dois estames, com antera grossa, pistilo com ovário com 4 óvulos, dos quais só um será fecundado, o que vai originar a semente (caroço), estilete e estigma com dois lóbulos (Garcia, 2005).

A produção de frutos dá-se nos ramos de um ano que se desenvolveram durante o ano anterior, sendo que nos meses de junho e julho ocorrem os maiores crescimentos.

O sistema radicular desta espécie tem uma forte capacidade de adaptação ao solo. O tipo de sistema radicular que desenvolve depende da origem da planta e das condições do solo. Uma planta de oliveira proveniente de estaca, forma inúmeras raízes adventícias, finalizando mais tarde por se comportar como principais. Por outro lado, se a semente for a origem da oliveira, a planta tem inicialmente uma raiz principal nos primeiros anos, sem ocorrer formação de raízes laterais (Barros, 2011). A profundidade e expansão do sistema radicular dependem do tipo de solo e da profundidade deste, assim como da porosidade e do teor em água (Rallo, 1999).

Classe	Magnoliopsida
Subclasse VI	Asteridae
Ordem	Scrophulariales
Família	Oleaceae
Subfamília	Oleoideae
Tribo	Oleceae
Género	<i>Olea</i> L.
Espécies	<i>Olea europaea</i> L.
Subespécies	<i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>sativa</i> Hoffm. et Link (= <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>europaea</i>) <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>oleaster</i> Hoffm. et Link (= <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>sylvestris</i>)

Figura 2 – Taxonomia e classificação da oliveira (Fonte: Jorge Bhom, 2013).

3.1.3. Clima

A oliveira é uma cultura de clima Mediterrâneo inserida nas latitudes 30° a 45° do Hemisfério norte e sul. Esta espécie está bem-adaptada às condições ambientais extremas do clima subtropical de verões quentes e secos (Lavee, 1996). As temperaturas ótimas para o desenvolvimento vegetativo estão compreendidas entre os 10°C e os 30°C, e acima dos 35°C a planta tem a capacidade de regular a sua temperatura fechando os estomas

(Loussete & Brousse, 1980). A oliveira para quebrar o repouso dos gomos florais, e assim poder frutificar, necessita de frio (Rallo & Martin, 1991).

Temperaturas excessivamente altas durante a maturação, provocam a redução do teor de ácido oleico, fazendo aumentar o ácido linoleico, sendo de todo indesejável (Rodrigues, 2014).

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

3.1.4. Solo

A oliveira desenvolve-se em solos com constituição e propriedades muito diversas, prosperando melhor em solos com moderada retenção de água, com boa permeabilidade e alguma profundidade efetiva. É uma planta muito resistente à seca, tolerante à salinidade, mas sensível ao encharcamento prolongado (Agustí, 2004), sendo uma das fruteiras mais sensíveis a condições anaeróbias do meio (Feio, 1991; Milheiro, 1992). Adapta-se a solos com pH ácido ou alcalino ($4,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$), preferindo solos com pH próximos da neutralidade, uma vez que é nessa zona de reação que se encontram as maiores disponibilidades de nutrientes (Milheiro, 1992).

3.1.5. Cultivares

Em Portugal continental estão descritas 22 cultivares de oliveira (Leitão *et al.*, 1986), sendo que, até final dos anos 90, perto de 80% do olival português era composto pela cultivar 'Galega Vulgar'.

As cultivares mais utilizadas nos olivais tradicionais e nos sistemas mais recentes são: 'Galega vulgar'; 'Picual'; 'Cobrançosa'; 'Cornicabra'; 'Verdeal'; 'Maçanilha de Tavira'; 'Azeiteira'; 'Cordovil'; 'Bical'; 'Blanqueta'; 'Arbequina'; 'Arbosana'; 'Koroneiki'; 'Oleana'; 'Frantoio' e 'Tosca' (Leitão *et al.*, 1986).

- **'Picual'**

Esta cultivar tem origem em Espanha e é utilizada em cerca de um terço da produção mundial de azeite. O rendimento em gordura é alto, com elevados índices de estabilidade e níveis de ácido oleico (Barranco, 2008). É uma árvore de porte médio,

apresentando produtividades elevadas (Barranco, 2008; Tous *et al.*, 1998). É muito sensível ao olho de pavão e ao verticílio e tolerante à tuberculose (Agustí, 2004). É a variedade mais utilizada na Andaluzia, tem uma boa propagação por estaca lenhosa e mediana por estaca herbácea.

- **‘Galega vulgar’**

Esta cultivar constitui mais de 80% do olival português e é utilizada principalmente nos olivais tradicionais e nos intensivos (Barranco, 2008; Leitão *et al.*, 1986). É facilmente multiplicável por estaca lenhosa. Destaca-se por ter frutos pequenos e de fraco teor em gordura (12 a 16%), dando, no entanto, origem a azeites finos, de alta qualidade e grande estabilidade. Apresenta muita tendência para a alternância e é bastante vigorosa, o que faz com que não seja usada habitualmente nos novos olivais super-intensivos. As árvores desta cultivar apresentam um porte médio e arborescência média, folhas compridas, largas e grandes. Possui uma entrada em produção precoce, tal como a maturação, sendo temporã e escalonada. É uma cultivar apreciada pela resistência à seca, mas é sensível ao frio à salinidade e ao calcário ativo. (COI, 2000). É suscetível à fumagina, à mosca da azeitona, à tuberculose, à antracnose, à cochonilha negra e resistente ao verticílio (Leitão *et al.*, 1986).

- **‘Cobrançosa’**

Esta cultivar transmontana, onde também conhecida por ‘Salgueira’ ou ‘Madural Salgueira’, constitui cerca de 24% das oliveiras existentes, numa área de cerca de 15.000 ha (Monteiro, 1999). É uma árvore de tamanho médio, bastante regular e com boas produções (Leitão *et al.*, 1986). Folhas pequenas, compridas e estreitas, tem propagação mediana a boa por estaca herbácea. Apresenta baixa sensibilidade ao olho-de-pavão, e elevada resistência à antracnose e à mosca da azeitona (Dias *et al.*, 2000). É uma cultivar vocacionada para a produção de azeite, apresentando bom rendimento e mediana riqueza em ácido oleico (Leitão *et al.*, 1986). É tolerante ao frio e à clorose férrica, sendo, no entanto, sensível á seca e á salinidade. Apresenta excelentes resultados em colheita mecânica com um regular rendimento em azeite (16 a 18%) e maturação normal. É uma cultivar bastante apreciada pela sua resistência a pragas e doenças o que faz com que seja muito utilizada.

Relativamente à suscetibilidade das variedades, segundo Gomes et al. (2009), a cultivar 'Galega vulgar', apresenta um nível de maturação bastante precoce em relação às outras variedades em estudo, em final de setembro e início de outubro, o que vai originar com que haja uma diminuição de compostos fenólicos totais e com coincidência das primeiras chuvas. Durante a maturação, a azeitona inicia a degradação dos componentes da parede celular, como a espessura da cutícula, contribuindo para a suscetibilidade dos frutos. Os autores referem que poderá ser uma das razões por esta cultivar ser severamente atacada pelo *Colletotrichum acutatum* e tornar-se bastante suscetível ao fungo, o que para isso, uma colheita mais precoce pode evitar ou diminuir a destruição das oliveiras, como a disseminação do agente patogénico. Os mesmos autores, referem que, a cultivar 'Cobrançosa' e 'Picual', por obterem uma maturação mais tardia, normalmente, até ao final de Novembro, quando ocorre uma maior severidade do fungo *Colletotrichum acutatum*, os frutos ainda não estão na fase do pintor e portanto, ainda têm altos níveis de compostos fenólicos, impedindo assim uma colonização mais elevada deste agente patogénico, logo, menos suscetíveis à antracnose.

3.1.6. Sistemas de condução

A imensa procura no aumento da eficiência da cultura e da produção, fez com que, na história da produção olivícola se organizasse o cultivo da espécie, passando de oliveiras dispersas, para olivais com compassos de 10x8m ou até mesmo de 10x10m, onde o espaço entre plantas era muitas vezes utilizado para consociações com a oliveira, como é o caso da vinha ou das culturas anuais como o centeio, cevada ou aveia. O aparecimento do regadio trouxe a cultura intensiva desta planta com compassos de 7x5m (mais comum) 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.

- **Olival tradicional**

Com uma densidade inferior a 120 árvores por ha, este olival ainda representa atualmente, quase 50% de todo o olival mediterrânico, estando fortemente ameaçado na sua viabilidade económica, pelo facto da sua conta de cultura não resistir à concorrência dos sistemas mais intensivos em que a produtividade não para de subir à medida que novas tecnologias vão sendo implementadas, fazendo com que os custos de produção

sejam cada vez menores (Bohm, 2013). Neste sistema de cultivo, a utilização do solo é em geral exclusiva, embora nem sempre, existindo a preocupação de realizar operações de manutenção do solo, para combater as infestantes, em geral mobilizações do tipo, gradagens ou escarificações superficiais, e a poda das árvores já obedece a um plano prévio, em que a forma da copa, altura do tronco e intervalo entre intervenções estão estabelecidas. Este sistema, possui compassos de plantação com grandes espaçamentos entre árvores, como 10x8m ou 10x10m, conseguindo-se densidades de 125 ou 100 plantas/ha respetivamente. obtêm-se produções elevadas por árvore, embora baixas por hectare (Cordeiro, 2014). A respeito das produções estas situam-se entre 1000 a 1800kg/ha (Cordeiro, 2014). Para além do sistema com compassos ordenados, é possível encontrar olivais tradicionais sem ordenação (Figura 3) estes olivais são formados por plantas dispersas sem distâncias definidas entre elas, muito frequentemente tal é devido a estes olivais ocuparem áreas de montes e serras, ou de solos com grande número de afloramentos rochosos (Bohm, 2013).



Figura 3 – Olival tradicional (Adaptado da Wilder, 2016).

- **Olival intensivo**

Neste sistema, há a preocupação de tirar o máximo partido da região ocupada com a cultura, aumentando as densidades de plantas para as 200 a 450 por ha (Figura 4) consoante solos e variedades, e introduzindo a rega, geralmente localizada do tipo gota-a-gota, como fator essencial da produtividade. As produtividades podem atingir as 7 a 9

toneladas por ha. Um dos aspetos importantes deste sistema, é a distribuição das plantas em retângulo, existindo sempre uma diferença de 2 a 3 metros entre a distância das plantas na entrelinha para as plantas na linha, esta exigência tem a ver com as exigências de mecanização, sobretudo na apanha mecânica com vibradores de tronco, a dimensão dos tratores utilizados e a colocação dos tubos de distribuição de água num dos sentidos do alinhamento das árvores, corta assim a possibilidade de aí passarem máquinas. Este sistema veio permitir a mecanização da cultura, como a poda mas principalmente a colheita, diminuindo os custos de produção e aumentando a produção por hectare relativamente ao olival tradicional. Neste sistema, o olival inicia a produção ao 3ºano após a plantação. Este sistema inclui compassos entre 5x7m, com uma densidade de 285 plantas por ha, 5x6m, com uma densidade de 333 plantas por ha (Bohm, 2013).



Figura 4 – Olival intensivo- Estação de melhoramento de plantas em Elvas (foto do autor).

- **Olival super-intensivo**

No final do séc. XX com origem em Espanha, há o aparecimento de um novo sistema de condução, o super-intensivo ou olival em sebe (Figura 5), caracterizado por um aumento de densidade de plantas (1200 a 2000 plantas/ha). Este novo método permite total mecanização da cultura incluindo a colheita e as podas (Todolivo, 2010). É um sistema de produção com um investimento inicial mais elevado, no entanto, é o que

permite produções mais elevadas assim como um retorno do investimento mais rápido (Bohm, 2013). Caraterizado por uma extraordinária precocidade da entrada em produção, obtendo elevadas colheitas logo entre o 3º e o 8º ano com uma manutenção da copa muito reduzida e a facilidade da apanha mecanizada. Atinge produções que facilmente ultrapassam as 12 ton e cuja colheita é extremamente facilitada pela utilização das máquinas cavalgadoras que colhem em continuo de um e outro lado da sebe. As cultivares utilizadas para plantações em compassos mais estreitos são caraterizadas por serem vigorosas, terem portes pequenos e bastante produtivas, como a Shikitita, Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Oleana ou Leziana (Todolivo, 2020).



Figura 5 – Olival super-intensivo na Herdade Torre de Figueiras (foto do autor).

3.1.7. Antracnose da oliveira (*Colletotrichum* spp.)

A antracnose é uma das principais doenças porque é limitante da produção de azeitona em todos os países olivícolas, embora com grande expressão nos olivais portugueses. Esta doença é provocada por várias espécies de fungos do género *Colletotrichum*. O fungo ataca em especial os frutos, mas também pode causar desfoliação e seca dos ramos. Os frutos sintomáticos apresentam manchas arredondadas de cor acastanhada em depressão e com aspeto oleoso (Figura 6). O fruto fica enrugado, mumificado e acaba por cair no solo. Nas folhas, normalmente surgem manchas amarelo-acastanhadas e com as margens mal definidas. Todo este conjunto de fatores, causam a destruição total ou parcial dos frutos, conduzindo ao desguarnecimento da árvore devido à queda das folhas e morte dos ramos.

A importância económica traduz-se pela diminuição do conteúdo da polpa, que, inevitavelmente, provocará um baixo rendimento em azeite, elevada acidez, características organolépticas desagradáveis, viscosidade e coloração alteradas (Sobreiro, 1993; Cantero, 1997; Alcobia & Ribeiro, 2001; Carvalho *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2005).

As espécies de fungos do género *Colletotrichum* associadas à antracnose na oliveira são as espécies *C. nymphaeae*, *C. fiorinae*, *C. godetiae*, *C. acutatum*, *C. rhombiforme* e *C. simmondsii* do complexo *Colletotrichum acutatum* e o *C. gloeosporioides* do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

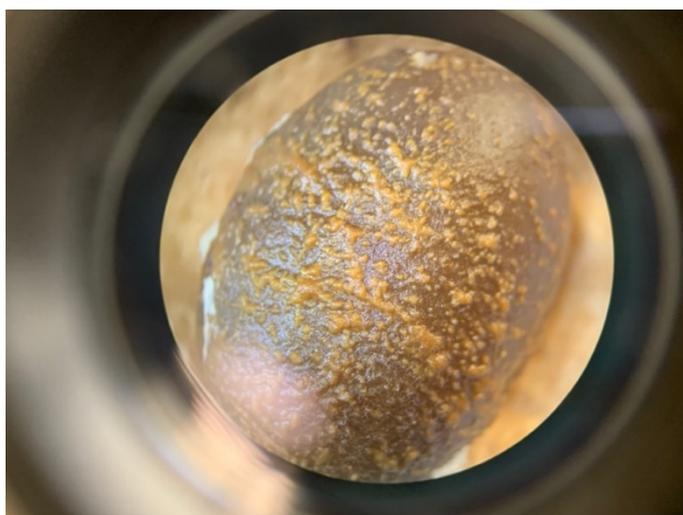


Figura 6 – Fruto visto á lupa com sintomas típicos de antracnose. Ampliação 40× (foto do autor).

- **Sintomatologia**

A sintomatologia dos ataques da gafa, como já referido anteriormente, pode ser observada em frutos, ramos e folhas. O sintoma mais característico da gafa é a podridão em depressão e o mumificado das azeitonas. Os ataques nos frutos, geralmente ocorrem quando estes mudam de cor (verde para roxo) e as condições climáticas favoráveis. No entanto, os sintomas são visíveis quer nos frutos verdes quer nos maduros, embora sejam mais fáceis de visualizar, porque o contraste é maior (Garcia & Cosialls, 1995). Os ataques podem ocorrer em qualquer parte do fruto, mas são mais frequentes no ápice, por este permanecer mais tempo molhado. A azeitona atacada, começa por apresentar uma ou várias manchas arredondadas, acastanhadas, em depressão e de aspeto oleoso, que vão alastrando em círculo, podendo atingir todo o fruto. Este engelha-se e mumifica-se, ficando preso à árvore ou caindo para o solo (Anónimo, s/d; Amaro, 1997). Em condições de humidade relativa elevada surgem, nessas lesões circulares em depressão (antracnose), massas gelatinosas de cor rosada-alaranjada dispostas concêntricamente, contendo as frutificações do fungo (Figura 7).



Figura 7 – Azeitona mumificada com massa de esporos (Fonte: OliVera, 2020)

- **Agente patogénico**

Colletotrichum spp. é o anamorfo, forma imperfeita ou assexuada do fungo *Glomerella*. Esta fase do fungo que é a causadora de antracnose é constituída por esporos do tipo conídios, hialinos, unicelulares, ovoides, cilíndricos e por vezes ligeiramente curvados. Estes esporos são produzidos em acérvulos. As massas de conídios são rosadas

ou cor de salmão. Os acérvulos são sub-epidérmicos e são libertados após o rompimento do tecido epidérmico dos hospedeiros colonizados. O fungo hiberna nos ramos, cancos e tecidos afetados, sob a forma de esporos ou micélio. O micélio é septado e hialino (Agrios 2005).

- **Desenvolvimento da doença (ciclo de vida)**

Após a entrada do fungo nos frutos, este começa a desenvolver o micélio e a partir daí ocorre o rebentamento da epiderme e formam-se os acérvulos na parte exterior da epiderme. Estas estruturas de frutificação do fungo, apresentam-se rodeados por longas coroas esbranquiçadas de hifas (Graniti *et al.*, 1993). Os acérvulos após atingirem a sua maturação, libertam os conídios que se encontram aglomerados em massas alaranjadas (Graniti *et al.*, 1993 & Amaro, 1997). O tecido necrótico formado pela colonização do fungo vai-se alastrando e o fruto apresentará uma podridão total e desidratação, o que levará ao processo de mumificação, seguida de necroses também nos pedúnculos, originando a queda prematura dos frutos. Os esporos do fungo, os conídios, são dispersos sobretudo pela ação da chuva que faz a separação dos conídios da massa gelatinosa dos acérvulos e os dispersa (Figura 8).

Para o início da germinação, é necessário que exista água livre, na superfície do fruto (Trapero & Roca, 2004). Na esporulação os conidióforos produzem na sua extremidade os conídios, esporos que são responsáveis pela dispersão da antracnose. No entanto, quando os esporos (conídios) ficam maduros, são libertados e transportados, pelo vento e pela chuva e quando tiverem um local propício que permita o seu desenvolvimento, irão transformar-se numa nova infeção (Cantero, 1997). Preferencialmente, o fungo infeta frutos maduros, sendo que os frutos sintomáticos que forem transformados em azeite irão depreciar a qualidade deste, provocando um aumento da acidez e alterando as características organolépticas (Carvalho *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos e histopatológicos realizados mostraram a presença do patógeno em órgãos vegetativos durante todo o ano, principalmente em folhas e ramos de oliveira, mas também em infestantes, pois, representam reservatórios de inóculo. Os conídios são dispersos pelas chuvas de primavera, atingindo flores e frutos jovens ou por chuvas de outono atingindo os frutos em pré-maturação. As azeitonas verdes que estão colonizadas não apresentam sintomas até haver a perfuração da cutícula, acontecendo ao fim da maturação a produção dos sintomas completos (Talhinhas *et al.*, 2011).

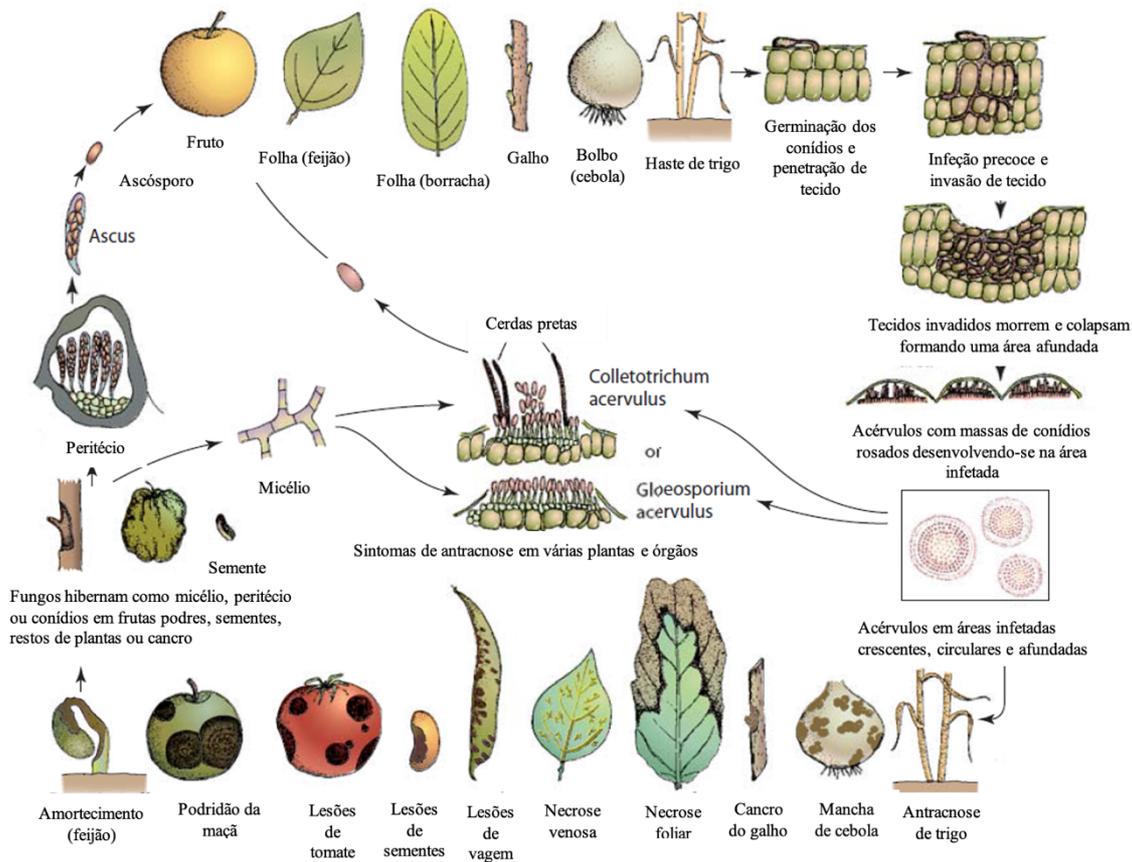


Figura 8 – Ciclo de vida de *Colletotrichum* spp. (Adaptado de Agridos, 2005).

Para que haja desenvolvimento, o fungo necessita dos principais fatores de nocividade. Os fatores históricos (historial da parcela), abióticos (temperatura/humidade relativa ou chuva, geada e granizo) e bióticos (susceptibilidade da cultivar, grau de maturação do fruto e presença de lesões prévias na epiderme). A esporulação necessita de temperaturas entre os 20 e 25°C (Azevedo, 1976).

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

Para além dos fatores de nocividade, existe também a susceptibilidade das diferentes cultivares, os ataques de *Bactrocera oleae*, que tornam até as variedades mais resistentes, susceptíveis, para além de condições técnicas no olival, que podem potenciar a dispersão do fungo, como, regas em excesso, solos mal drenados, frutos infetados que permanecem no olival que vão servir de inoculo para o ano seguinte (Trapero & Blanco, 2004).

• Etiologia e Epidemiologia

Historicamente, o agente causal da doença, foi o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, não obstante, estudos mais atuais, particularizam para que o principal agente, seja a espécie *Colletotrichum acutatum* (Martín & Garcia-Figueres, 1999; Perez *et al* 2005). Entre 1997 – 2000, aquando do acontecimento das graves epidemias que devastaram a região de Andaluzia em Espanha, a espécie predominantemente identificada foi *C. acutatum*, dando o indicativo de melhor adaptação da mesma às condições ambientais da região (Oliveira & Trapero, 2001).

Os conídios de *Colletotrichum* spp. apresentam-se de forma unicelular, hialinos e de forma cilíndrica na sua germinação, desenvolvem um tubo germinativo, o que poderá originar micélio e conídios secundários, ou formar apressório e hifa de penetração. O fungo consegue penetrar na epiderme intacta, uma vez que produz enzimas que lhe permitem degradar as células da epiderme (Figura 9). Contudo, a existência de feridas facilita a sua entrada, como das causadas por *Bactrocera oleae*, a mosca da azeitona, através tanto do orifício da oviposição como pelo orifício de saída da larva. De seguida, já dentro dos frutos, o fungo desenvolve o micélio, a partir do qual se vão formar os acérvulos subepidérmicos, normalmente rodeados por longas coroas periféricas esbranquiçadas de hifas (Graniti *et al.*, 1993). Por fim, ao iniciarem a maturação, os acérvulos começam a sair para o exterior, libertando os conídios aglomerados, numa massa gelatinosa cor rosada alaranjada dispostas concentricamente, contendo as frutificações do fungo (Graniti *et al.*, 1993 & Amaro, 1997).

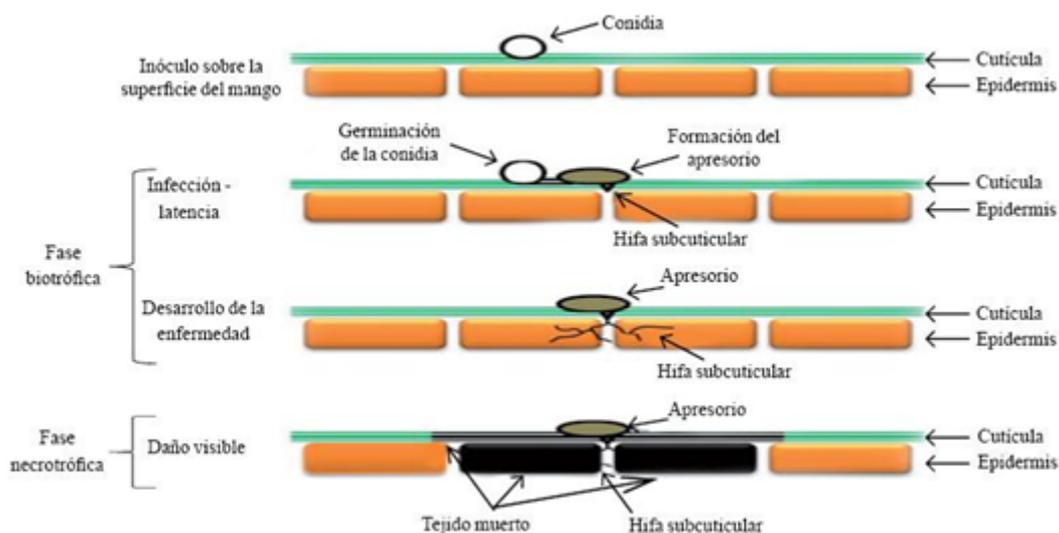


Figura 9 – Processo de infecção dos conídios na epiderme da azeitona (Adaptado de Bailey *et al.*, 1992).

Os conídios apresentam um poder germinativo invariável durante 15 dias, reduzindo-se entre os 15 e os 30 dias, sendo destruídos depois de 30 dias. Apesar de tudo isto, os conídios conseguem suportar 2 a 3 horas de exposição ao sol, sem perderem capacidade de germinação (Cantero, 1997; Trapero & Blanco, 2004).

Como já referido anteriormente, a temperatura influencia não só a germinação dos esporos e, com isso, causando a contaminação do hospedeiro, mas também o desenvolvimento do fungo no interior do fruto. 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 pode acontecer em temperaturas compreendidas entre 0 e 30°C. Azevedo (1976), afirma que aos 25°C, os conídios necessitam apenas de 2 horas para se desenvolverem, por outro lado, temperaturas entre 0 e 5°C necessitam de 8 horas, neste intervalo, apenas 60% germinam e abaixo dos 5°C ou superiores a 30°C só germinam 10%.

O período de incubação, em condições excelentes, é de 4 a 6 dias (Trapero & Blanco, 2004). Consequentemente, se as condições favoráveis se mantiverem durante o Outono podem ocorrer variados ciclos de infeções secundárias, originando enormes prejuízos. A 5°C, o desenvolvimento do fungo processa-se lentamente e a 0°C cessa, como referiu Amaro (1997).

Apesar de haver duas épocas do ano para o bom desenvolvimento do fungo, primavera e outono, no outono, os prejuízos são mais importantes pois há existência de frutos, órgão preferencialmente atacado por este fungo.

- **Meios de proteção e controlo**

A proteção do olival contra a antracnose compreende vários fatores culturais, tais como: 1) A utilização de compassos de plantação adequados, 2) A realização de podas para promoverem o arejamento e iluminação da copa e conseqüente redução da humidade, 3) A destruição das fontes de inóculo (folhas e frutos infetados) para evitar ao máximo a infeção no ano seguinte, 4) A antecipação tanto quanto possível da colheita (se as condições forem propicias ao desenvolvimento da doença), 5) A laboração imediata da azeitona (para evitar que o fungo se disperse para outros frutos durante o armazenamento).

Também a seleção da cultivar a utilizar é de extrema importância, uma vez que a suscetibilidade é muito diversificada e dependente da espécie de fungo existentes na região (Cacciola *et al.*, 2012; Talhinhos *et al.*, 2015, Moral *et al.*, 2017).

Em áreas de elevada incidência, o controlo da doença é alcançado principalmente através da aplicação de fungicidas cúpricos aquando das primeiras chuvas outonais, antes do aparecimento dos primeiros sintomas.

O controlo da mosca da azeitona é de extrema importância para a prevenção da antracnose. A relação antracnose/mosca da azeitona pode alterar a suscetibilidade das variedades como o caso da 'Galega Vulgar', uma vez que as feridas provocadas pela praga nos frutos são excelentes para promover a entrada e instalação do fungo (Trapero & Blanco, 2004).

Para combater quimicamente, estão homologadas substâncias ativas de contacto como o hidróxido de cobre, oxiclureto de cobre e o sulfato de cobre e cálcio. Estudos recentes mostraram que a infeção por *Colletotrichum* spp. não se faz apenas localmente, mas sim, que estes fungos podem permanecer sistemicamente nas árvores e passarem para o ovário das flores, e permanecerem no fruto constituindo o inóculo primário da infeção (Materatski *et al.*, 2018). Este conhecimento permite aos olivicultores adotar outras medidas de proteção do olival contra a antracnose, nomeadamente a utilização de fungicidas sistémicos na primavera de modo a limitar a quantidade de inóculo no interior da planta e reduzindo desse modo o inóculo primário.

3.2. A importância do cálcio nas plantas

3.2.1. O cálcio como nutriente

O cálcio é um elemento indispensável e determinante no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois, para além de participar em alguns processos fisiológicos, está envolvido na estabilidade estrutural das paredes celulares.

Nas plantas, e ao contrário dos outros macronutrientes, o cálcio encontra-se em grande parte localizado nas paredes celulares (Faust, 1989), devendo-se à capacidade que as cadeias helicoidais de ácido poligalacturónico da lamela média têm de se condensar por pontes de cálcio (Tucker, 1993) e à pouca mobilidade que este nutriente tem para se deslocar dentro das plantas (Marschner, 1995).

Com um papel importante na divisão celular e no fortalecimento das paredes celulares, este macronutriente tem merecido uma considerável atenção nos últimos anos, visto que tem um efeito positivo na manutenção da qualidade dos frutos, podendo reduzir a respiração, atrasar a maturação, incrementar a firmeza da polpa, estender o período de armazenamento dos frutos (Yamamoto *et al.*, 2011) e retardar os processos de maturação dos frutos por atrasar a senescência (Klaus 2007). Este nutriente contribui ainda para a integridade do complexo membrana-parede celular, tendo um efeito importante no controlo de distúrbios fisiológicos e na manutenção da qualidade do produto final (Taiz & Zeiger, 2004).

É dos principais nutrientes essenciais das plantas, desempenhando papéis importantes no crescimento e desenvolvimento dos frutos, bem como na manutenção da sua qualidade e firmeza, como constituinte das paredes e membranas celulares, proporcionando proteção e resistência contra pragas e doenças (White & Broadley, 2003; Kadir, 2005). A deficiência deste nutriente nas plantas pode causar o declínio da qualidade dos frutos, bem como do rendimento da produção para além de encurtar o prazo de validade dos respetivos frutos (White & Broadley, 2003).

A concentração de cálcio presente nas plantas depende de variados fatores, mais concretamente, da cultivar, tipo de solo, condições ambientais, e estado de maturação dos frutos (Conway *et al.*, 1990). Neste caso, é importante o fornecimento regular de cálcio às plantas para aprimorar os seus mecanismos naturais de resistência e aumentar a sua biodisponibilidade (Conway *et al.*, 1990; Gómez-Galera *et al.*, 2010).

A imobilidade de alguns nutrientes no floema faz com que a eficiência da pulverização foliar desses elementos seja discutida. O cálcio é considerado um elemento

pouco móvel na planta e sua translocação dá-se, principalmente, em direção acrópeta ou polar, ou seja, movimenta-se da base para o ápice e dificilmente o contrário, seguindo o fluxo de transpiração e, portanto, o fluxo xilémico (Wittwer & Teubner, 1959). Desta forma o Ca^{2+} é acumulado principalmente nos órgãos de maior transpiração, que são as folhas. A sua distribuição na planta é realizada por fluxo de massa, via xilema, sendo o cálcio considerado de baixa mobilidade no floema. Dessa forma, o fluxo desse elemento para os órgãos reprodutivos é menor (Malavolta, 2006).

A aplicação de cálcio às plantas faz-se geralmente através da fertirrega podendo aplicar-se foliarmente. A ligação do cálcio à superfície das folhas e a posterior entrada pela via foliar implica a ligação deste catião aos polissacarídeos que constituem a cutícula das folhas que apresentam cargas negativas, originando a entrada destes através da cutícula foliar (Salisbury & Ross, 1992).

3.2.2. O cálcio e as paredes celulares

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa e dinâmica, constituída por diversos polissacarídeos, agregados em celulose, hemiceluloses e pectinas (Lima *et al.*, 2001; Cantu *et al.*, 2008; Hématy *et al.*, 2009) representando 35%, 15% e 40% respetivamente da composição da parede celular (Figura 10) Para além da sua função de suporte, a parede celular está envolvida no crescimento e desenvolvimento das plantas, através do controlo da velocidade e direção da expansão das células (Brett & Waldron, 1996). A parede celular confere também proteção contra danos mecânicos e é a primeira barreira física que as plantas possuem na interação com o ambiente (Puhlmann *et al.*, 1994). Nesta estrutura, estão presentes também, glicoproteínas estruturais, compostos fenólicos, minerais e enzimas (Goulao *et al.*, 2010). A lamela média é uma camada extremamente fina, que separa duas células vegetais, consistindo em grande parte por substâncias pécticas (Brett & Waldron, 1996). A parede primária consiste essencialmente em microfibrilhas de celulose envolvidas numa matriz de hemiceluloses e pectinas, proporcionando simultaneamente robustez e flexibilidade (Taiz & Zeiger, 2002). A lamela média é a região mais dinâmica da parede, suportando o apoplasto por onde circulam muitos metabolitos. Esta região da parede celular parece estar envolvida em processos de proteção contra agentes patogénicos, impede ainda a desidratação e outros stresses ambientais, proporcionando um meio de circulação para moléculas de sinalização e de interações célula-célula (McNeil *et al.*, 1984). Esta vai sendo remodelada durante o

crescimento e desenvolvimento da célula e assim que esta atinge o seu crescimento final, em alguns tecidos, deposita-se uma parede secundária (Hématy *et al.*, 2009). Esta desenvolve-se proporcionando apoio e suporte a estruturas mais desenvolvidas nas plantas, contém lenhina, uma maior percentagem de celulose que a parede primária, possui na sua constituição diferentes tipos de hemiceluloses, e reflete o estado de diferenciação da célula (Taiz & Zeiger, 2002).

Existem variados tipos de ligações entre os diferentes polímeros constituintes da parede celular. As microfibrilhas de celulose estabelecem ligações por pontes de hidrogénio entre si, o mesmo se verifica entre as microfibrilhas e as hemiceluloses. Os polissacarídeos das paredes celulares primárias mais concretamente os polissacarídeos da lamela média têm a particularidade de se associarem por intermédio de catiões, tais como o cálcio (Rato, 2008). Desta maneira, os iões Ca^{2+} na lamela média vão ligar-se aos grupos carboxilo não esterificados do ácido galacturónico formando ligações por pontes de cálcio, dando origem a uma estrutura conhecida por 'egg-box'. A ligação por pontes de cálcio, apesar de não ser das mais resistentes, vai tornar as paredes estruturas mais sólidas (Tucker, 1993).

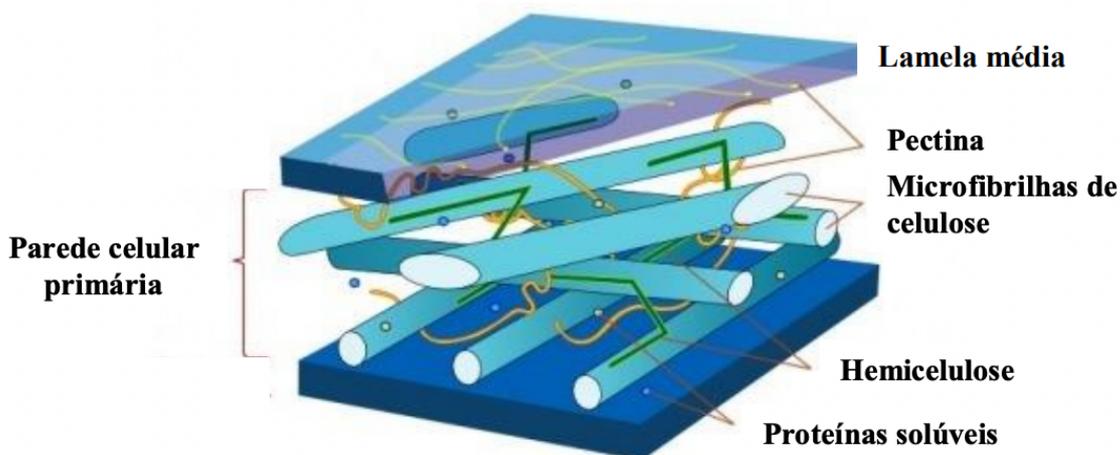


Figura 10 – Esquematização da parede celular vegetal (Adaptado de Villarreal, 2007).

A remodelação e a reorganização da parede celular durante a maturação dos frutos contribui para uma redução da resistência da parede, tornando os frutos mais suscetíveis a serem infetados por agentes patogénicos (Cantu *et al.*, 2008). Estes aproveitam a vulnerabilidade do hospedeiro, durante as alterações características da maturação para infetar os frutos (Sasidharan *et al.*, 2011).

Apesar de todas as ótimas características deste elemento, o cálcio tem pouca presença em atividades enzimáticas e é pouco redistribuído na planta. Como consequência, os órgãos mais jovens da planta são os mais afetados e é onde se nota a sua deficiência. É pouco móvel no solo e a sua absorção muito limitada pelo que se opta frequentemente por aplicações foliares deste nutriente.

Cerca de 60% do cálcio celular encontra-se localizado na parede celular (lamela média), onde exerce o efeito de estabilizador, o que pode influenciar a textura, firmeza e na maturação dos frutos (Hanson *et al.*, 1993). A sua presença na parede celular é uma característica intrínseca das células vegetais. A célula vegetal pode apresentar parede primária e secundária, e uma lamela média rica em pectato de cálcio (Paiva *et al.*, 2009). Os frutos apresentam apenas parede celular primária, esta última é formada por fibras de celulose entrelaçadas por moléculas de pectinas e hemiceluloses como já foi descrito anteriormente. As pectinas da lamela média encontram-se associadas por pontes de Ca^{2+} sendo solubilizadas por extração com agentes quelantes como o CDTA (Jarvis, 1982); (Jarvis *et al.*, 1981).

O Ca^{2+} tem um papel estabilizador importante ao nível da lamela média, ligando-se às pectinas presentes na lamela média, promovendo uma maior rigidez aos tecidos dos frutos (Ferguson & Drobak, 1988). Neste contexto, também essa resistência e rigidez é conseguida nas células da epiderme dos frutos, conseguindo-se assim maior resistência à degradação da epiderme e conseqüentemente, um aumento de resistência a fatores adversos ao fruto.

Vários estudos comprovam a eficiência da aplicação de cálcio em frutos. Segundo Rolle & Chism (1987), a presença de Ca^{2+} no fruto aumentou a firmeza e atrasou a maturação do fruto. Chardonnet *et al.* (2003), observaram em maçãs sujeitas a 6 meses de conservação que a concentração do cálcio total se mantinha estável, enquanto a concentração de cálcio da parede triplicava. Natale *et al.* (2005), avaliaram modificações na parede celular da goiaba, em frutos submetidos à aplicação de cálcio. Os frutos que receberam Ca^{2+} , tiveram as paredes celulares e as lamelas médias bem definidas e estruturadas. Nos frutos sem aplicação de cálcio, as paredes celulares estavam desestruturadas e com a lamela média desorganizada e menos resistente. De igual modo, a aplicação de Ca^{2+} a maçãs antes da colheita, fez aumentar o teor de hemicelulose e pectinas e Ca^{2+} na polpa dos frutos.

As paredes celulares das células vegetais, em específico de legumes e dos frutos, apresentam na sua composição uma significativa proporção de polissacarídeos (pectinas),

que são um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas e o componente principal da lamela média (Goldberg *et al.*, 1985).

3.2.3. Aplicação de cálcio às plantas

O cálcio é um elemento pouco móvel nas plantas, tem pouca presença em atividades enzimáticas e tem dificuldade em se redistribuir na planta. Nem todas as espécies têm a mesma capacidade para absorver cálcio e por isso, consoante a mobilidade, existem duas formas do nutriente começar a circular no sistema vascular da planta. Uma é aplicando-o na fertirrega outra é através da adubação foliar.

É igualmente importante conhecer o ritmo de absorção dos nutrientes ao longo do ciclo da oliveira para um correto posicionamento da aplicação de nutrientes (Garcia, 2009).

A fertirrega, consiste na aplicação conjunta da água e dos nutrientes de acordo com as exigências das plantas, o que, no olival de regadio é frequente o uso de fertirrega. Esta forma de aplicação possibilita adubar com bastante frequência, de forma fracionada, evitando a concentração de sais no solo, perdas por drenagem e vai possibilitar à planta absorver os elementos nutritivos de forma gradual, de acordo com as necessidades de cada fase do seu ciclo cultural (Branco, 2016).

Algumas pesquisas desenvolvidas desde o século XVII testam a hipótese de que não só as raízes absorvem nutrientes, mas também as folhas. A partir dessas descobertas a adubação foliar vem sendo aplicada na correção ou prevenção de carências de nutrientes, complementando o fornecimento por via solo (Brown, Patrick H, Fernández, 2015).

Diversas discussões foram realizadas quanto aos mecanismos e estruturas de absorção dos nutrientes relativamente à superfície foliar. Segundo alguns autores os mecanismos de captação ativa, troca iónica e difusão podem ser basicamente os mesmos que ocorrem nas superfícies das raízes, para a absorção pela parte aérea (Wittwer & Teubner, 1959).

A absorção foliar pode ser realizada através da abertura estomática, de irregularidades na camada cuticular, camada esta que é composta por hemiceluloses e pectinas (Wójcik, 2004).

A circulação de cálcio nas plantas está associada à circulação de água no xilema pelo que, falta ou excesso de humidade no solo pode interferir com a absorção de cálcio.

Durante os períodos de stress hídrico, os frutos e folhas jovens não têm a mesma capacidade de transpiração que o resto da planta. Desta forma, o fluxo de cálcio é interrompido e estes órgãos não conseguem receber este nutriente nas quantidades pretendidas e para tal a aplicação foliar é bastante mais eficaz. (Lusosem, 2020).

Esta é uma técnica utilizada para fornecer nutrientes às plantas, envolvendo a assimilação de nutrientes pelas folhas, mas não deve ser considerada substituta da fertilização convencional pelo solo, que envolve assimilação de nutrientes pelas raízes (Nachtigall *et al.*, 2010). A adubação foliar deverá de ser considerada uma técnica complementar de um programa de adubação. A sua utilização deverá ocorrer em períodos críticos de crescimento da planta, em momentos de alguma falta de nutriente ou em casos de situações adversas do solo que comprometam a nutrição mineral das plantas (Nachtigall & Nava, 2010).

É um método que permite, maximizar a absorção pelas plantas em caso de absorção deficiente pelo sistema radicular, devido a condições desfavoráveis no solo ou do clima e ainda, uma correção mais rápida em caso de desequilíbrio nutricional (Jordão, 2014).

Diversos fatores afetam a eficiência da adubação foliar e dependem da planta, do meio e da solução aplicada. A absorção foliar de nutrientes depende da presença de tricomas ou pelos, que aumentam a penetração do nutriente por aumentar a superfície de contato entre a folha e a solução aplicada (Malavolta, 2006). A absorção foliar depende ainda da idade da folha já que a menor cutinização das folhas mais jovens facilita a absorção e do maior potencial de absorção da parte abaxial da folha, que tem uma cutícula mais delgada que a parte adaxial (Pessoa, 2011).

4. Materiais e Métodos

4.1. Localização, solo e clima

O campo experimental onde foram realizados os estudos inerentes a este trabalho situa-se em Elvas, mais concretamente na Estação de Olivicultura de Elvas – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). Está localizado nas coordenadas 38°54'11''N e 7°08'26''O (Figura 11).

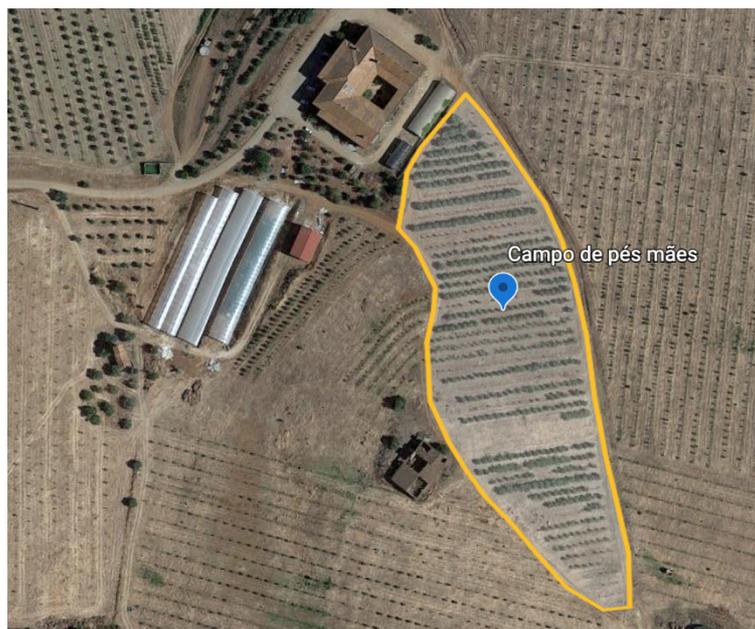


Figura 11 – INIAV – Departamento de Olivicultura (Campo de pés mãe). (Fonte: www.googleearth.com).

Em conformidade com a carta de solos de Portugal número 37-A, o olival localizado na Figura 11 (Campo pés-mães), encontra-se instalado numa mancha mista de solos Mediterrâneo Vermelhos ou Amarelos de Calcários Cristalinos associados a outras Rochas Cristalofílicas Básicas (Vcv) e de solos Calcários Vermelhos associados a dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas (Vc') com cerca 3% de declive. São solos argiluvitados pouco insaturados que se caracterizam por apresentarem um perfil ABC, que pode ir a 0,5m de profundidade, com pH entre 6 e 7. O grau de saturação do horizonte B é superior a 35% e aumenta, ou pelo menos não diminui, com a profundidade e nos horizontes subjacentes. Estes solos são formados a partir de rochas calcárias e apresentam cores avermelhadas ou amareladas nos horizontes A ou B ou em ambos, quando situados em climas com características mediterrâneas. Trata-se de um solo em que o horizonte A

apresenta textura mediana, franca, por vezes franco-argilosa, estrutura grumosa ou grumosa fina – moderada e friável (Cardoso, 1965). Apresenta alguns afloramentos rochosos na parcela.

Pela classificação de Köppen, Elvas é abrangida por um clima Mediterrânico Mesotérmico húmido de verão quente (Csa), sendo o Inverno chuvoso com temperaturas moderadas e o Verão quente e seco (Miranda, 2001). Considerando o período normal de 1971-2000, a temperatura média anual é 16,3°C e varia entre 8,6°C do mês de Janeiro e 25,1°C do mês de julho. A precipitação média anual é de 535,4mm. A frequência de chuvas está concentrada nos meses de inverno e primavera, sendo o Verão uma estação seca, como se pode verificar na Figura 12, que vai ao encontro do gráfico termopluiométrico com dados de 30 anos (1971-2000) da pluviosidade e da temperatura para Elvas.

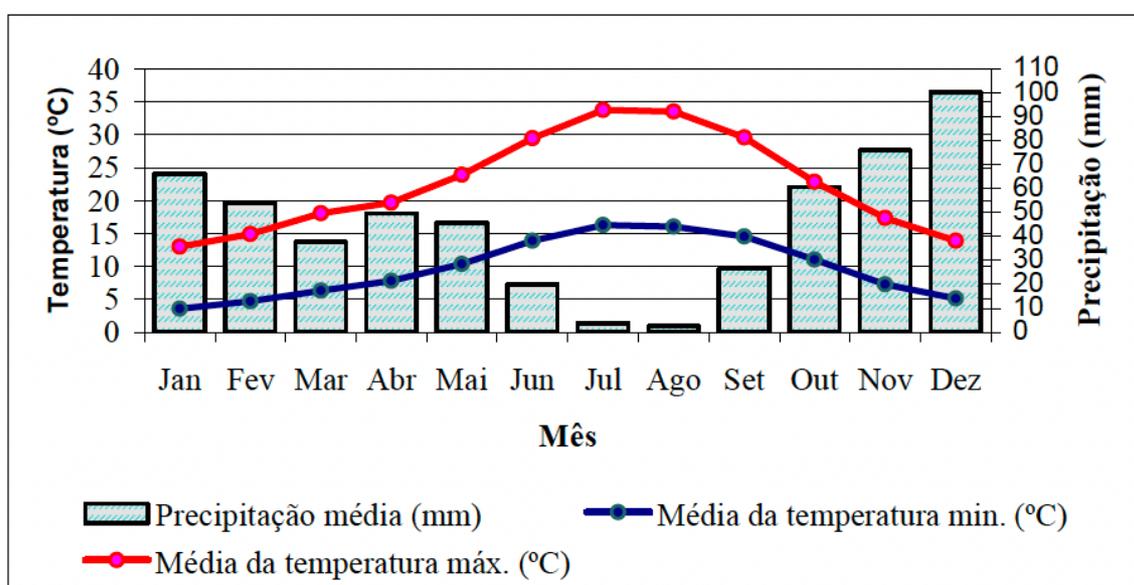


Figura 12 – Gráfico termopluiométrico de 30 anos (1971-2000) da pluviosidade e das temperaturas mínimas e máximas (Estação meteorológica da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas).

4.2. Caracterização do material vegetal

4.2.1. Descrição do ensaio e colheita de amostras

Neste trabalho foram escolhidas três cultivares (‘Galega vulgar’, ‘Cobrançosa’ e ‘Picual’), tendo em conta a suscetibilidade relativamente ao fungo *Colletotrichum acutatum* que estará sobretudo relacionada com a constituição da camada epidérmica dos frutos. As mesmas estão inseridas num olival (Figura 13) que foi instalado no ano de

1982, com árvores provenientes de seleção monoclonal, constituído por vinte e duas cultivares das quais cerca de 76% são portuguesas e as restantes 24% são espanholas. Encontra-se em regime de regadio com um compasso de plantação de 2x5m, considerando-se assim um olival intensivo, tendo uma orientação das linhas ENE-OSO.



Figura 13 – Olival intensivo do ensaio - 2x5 m.

Estas três variedades foram sujeitas a fertilizações foliares com formiato de cálcio com base nas três dosagens seguintes, tendo-se identificado os lotes de frutos com as letras: T, 1D, 2D, como sendo respetivamente a testemunha (T) apenas com aplicação de água; o lote dos frutos (1D) onde se aplicou o formiato de cálcio na dose de 2 Kg/ha (recomendado nas especificações do produto); o lote dos frutos (2D) onde se aplicou o formiato de cálcio na dose de 4 Kg/ha.

- “T”- Onde não houve aplicação de cálcio
- 1D- 1ª Dose – Ca 2 Kg/ha – Dose recomendada
- 2D- 2ª Dose – Ca 4 Kg/ha – Dose dupla

As datas em que se efetuaram as aplicações estão apresentadas na Tabela 1:

Tabela 1 – Datas das aplicações de cálcio.

Aplicações	Data
1 ^a	14-08-19
2 ^a	01-09-19
3 ^a	23-09-19
4 ^a	13-10-19

O ensaio é assim composto por três variedades, três níveis de aplicação de formiato de cálcio com 3 repetições por tratamento, conforme representado na Figura 14, sendo a árvore a unidade experimental. As análises foram efetuadas quer aos frutos quer às folhas em duplicado.

Foram realizadas 4 aplicações de cálcio através de um pulverizador de jato transportado acoplado a um trator sob a forma de ião “formiato de cálcio” (CaO), comercializado com a marca “Calfinish” sob a patente comercial da “Nutrisapec Tradecorp Portugal”, realizadas 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.

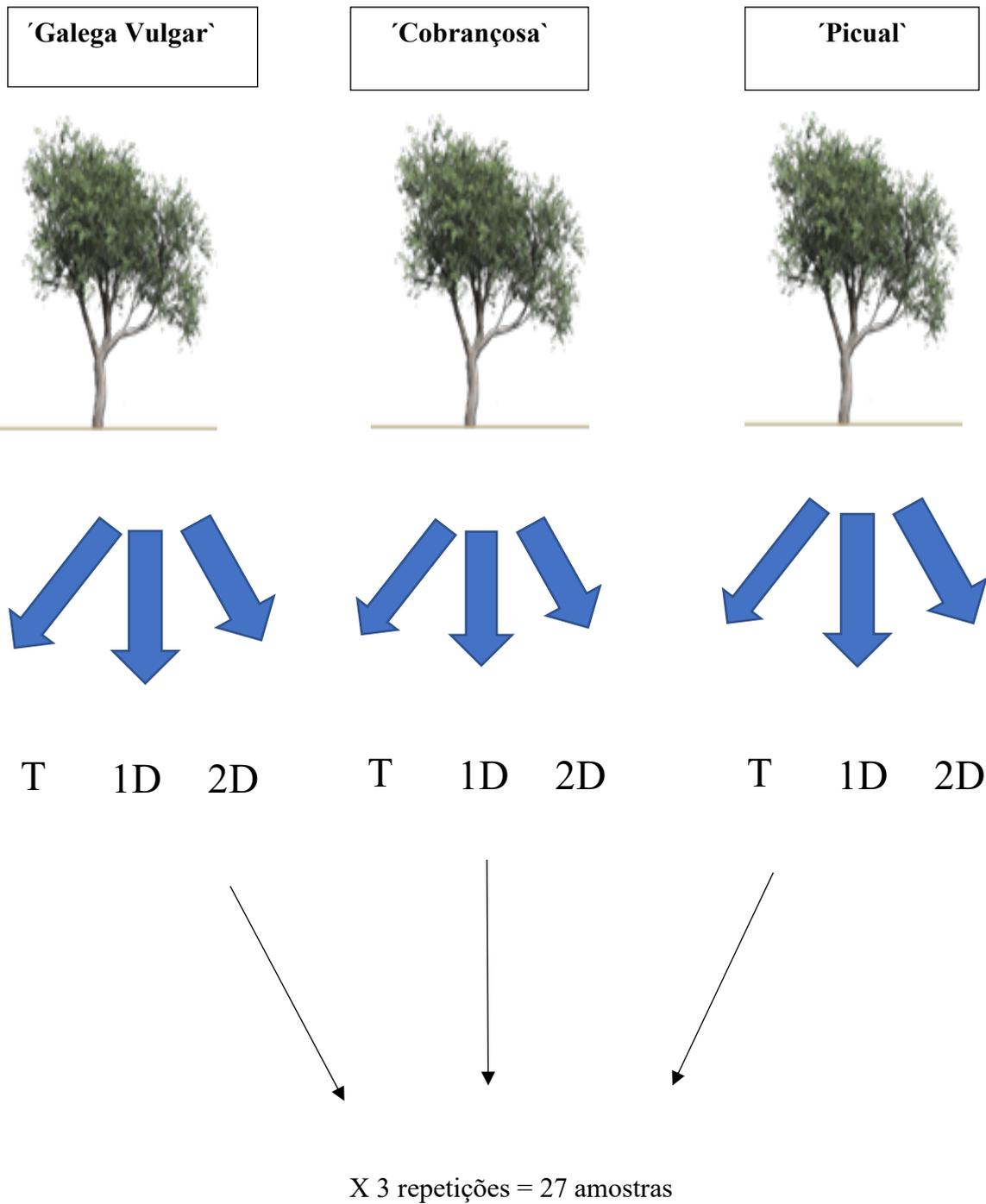


Figura 14 – Esquema do ensaio dos tratamentos efetuados e origem das amostras recolhidas.

4.2.2. Colheitas do material vegetal

Foram realizadas no total de três colheitas, tanto de frutos como de folhas:

- A 1ª colheita aconteceu no 02/10/19 para a observação de formas latentes em frutos;
- A 2ª colheita no dia 22/10/19, só de 'Galega vulgar' devido ao grau de maturação já avançado, existente na altura;
- A 3ª colheita no dia 05/11/19, de 'Cobrançosa' e 'Picual'.

As folhas e os frutos foram colhidos ao redor da copa de modo a ter uma amostragem homogênea dos frutos presentes nas árvores e trazidos para o laboratório onde foram processados.

Como já referido anteriormente, as colheitas dos frutos aconteceram em datas diferentes, para obtermos uma uniformidade de maturação em laboratório e conseguir com que as diferentes variedades estejam todas ao mesmo nível de cor/maturação para o processo da inoculação do *Colletotrichum acutatum*. A amostra colhida foi aproximadamente de 1,5 Kg, os frutos foram lavados com água destilada e um lote, cerca de metade, foi congelado para estudos posteriores e outro foi utilizado para a avaliação da presença de formas latentes de fungos nos frutos. Do lote congelado, parte foi utilizado para a determinação da fração das paredes celulares dos frutos.

Uma parte das folhas colhidas de cada variedade e de cada tratamento foram lavadas com água destilada e secas, cerca de uma semana a 70°C para a determinação da matéria seca, as restantes foram lavadas com água destilada e processadas de forma a ser possível quantificar a fração das paredes celulares (AIR).

4.2.3. Pesquisa de formas latentes de fungos nos frutos

A primeira colheita ocorreu no dia 02/10/19, com o objetivo de observar a possibilidade de existência de formas latentes de *Colletotrichum* spp. ou outros fungos, presentes no interior dos frutos. Era importante avaliar, principalmente, se os possíveis fungos causadores da antracnose, poderiam estar no estado latente no interior do fruto de modo que posteriormente não houvesse interferências com a inoculação externa (ponto 4.2.4) Para isso, foi realizada uma desinfecção superficial dos frutos com hipoclorito de sódio a 3% (Figura 16) e posteriormente lavados com água destilada. Este procedimento teve como objetivo eliminar possíveis fungos saprófitas e/ou fungos fitopatogênicos

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. Os frutos foram observados semanalmente durante 2 semanas (Figura 15).

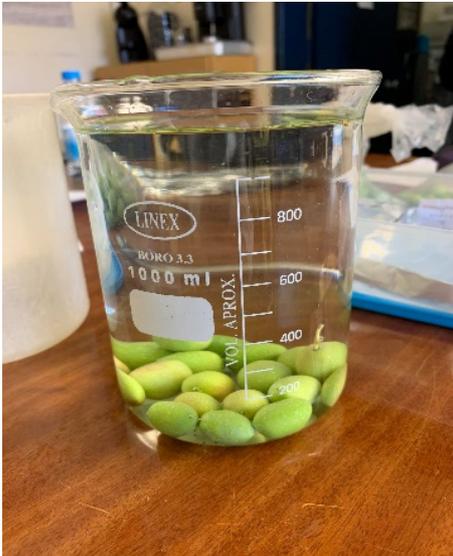


Figura 16 – Frutos desinfectados com hipoclorito de sódio.



Figura 15 – Incubação das variedades em caixas de plástico.

4.2.4. Inoculação das três variedades com um isolado de *C. acutatum*

As três variedades foram todas inoculadas com o fungo *Colletotrichum acutatum* isolado de azeitona, da coleção de fungos do Laboratório de micologia do MED/Universidade de Évora. O material de vidro, plástico e os meios de culturas utilizados foram sujeitos a esterilização em autoclave (Uniclave 88), à temperatura de 120° C, durante 20 minutos. Todo o processo de manuseamento do fungo ocorreu à chama de um bico de Bunsen, de forma a contribuir para a diminuição do risco de contaminações por microrganismos não desejados. O fungo *Colletotrichum*, pertencente à coleção de fungos fitopatogénicos da estação de olivicultura de Elvas, foi repicado em placas de Petri de 90mm, com meio de cultura “Potato Dextrose Agar” (PDA), na proporção de 39 g em 1L de água miliQ (Millipore, Direc-Q® 5UV, Guyancourt, France), para posterior utilização durante o decorrer do trabalho.

Todas as variedades em estudo foram inoculadas com o *Colletotrichum* spp., em ambiente controlado e com condições de humidade e temperatura perfeitas para a evolução do fungo (Figura 17).

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, o isolado cultivado em placa foi colocado em água miliQ de modo a formar uma suspensão de esporos com uma concentração de 1×10^6 esporos/ml (Talhinhas *et al.*, 2015). A suspensão preparada foi pulverizada, com um pulverizador manual de 250mL a todos os frutos das diversas fases em estudo, pelo método de nebulização (Figura 18).



Figura 17 – Placa de Petri com o isolado de *Colletotrichum acutatum* em cultura pura.

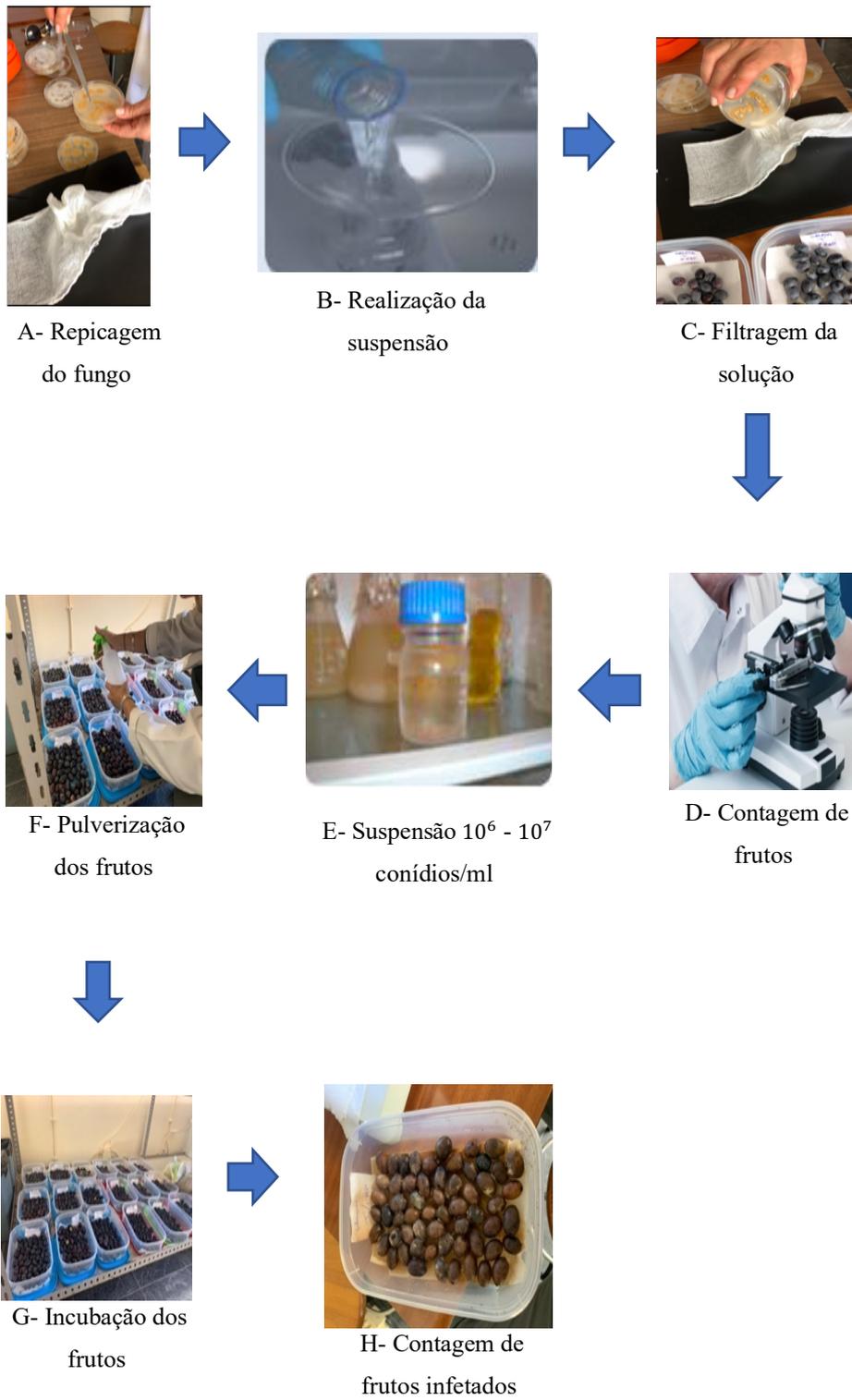


Figura 18 – Metodologia para incubação e inoculação de *Colletotrichum*.

4.3. Análises efetuadas ao material vegetal

4.3.1. Extração das paredes celulares das folhas

Para proceder à obtenção do AIR (Resíduo Insolúvel em álcool = parede celular, (Figura 19), foi realizada uma extração desta fração tanto ao nível das folhas como dos frutos. Nas folhas o processo iniciou-se com a lavagem das mesmas para retirar qualquer tipo de produto químico para conseguir valores coerentes. De seguida, com azoto líquido, congelaram-se as amostras e trituraram-se até ficar um pó. Adicionou-se 200 ml de etanol a 80% à amostra, triturou-se no ultraturrax a 1500 rpm dentro do copo para se conseguir que a amostra ficasse mais fina e levou-se à ebulição com magneto durante 10 minutos. Filtrou-se num funil de placa porosa revestido com um papel de filtro no fundo e com o auxílio de um quitasato foi recolhida a amostra do AIR, e depois lavada duas vezes em éter dietílico, e filtrada novamente, em seguida foi registado o peso da amostra pesando-se a amostra no papel de filtro após secagem em estufa a 40°C até completa evaporação do solvente. A amostra seca e recolhida foi designada resíduo insolúvel em álcool (AIR das folhas, Figura 19).

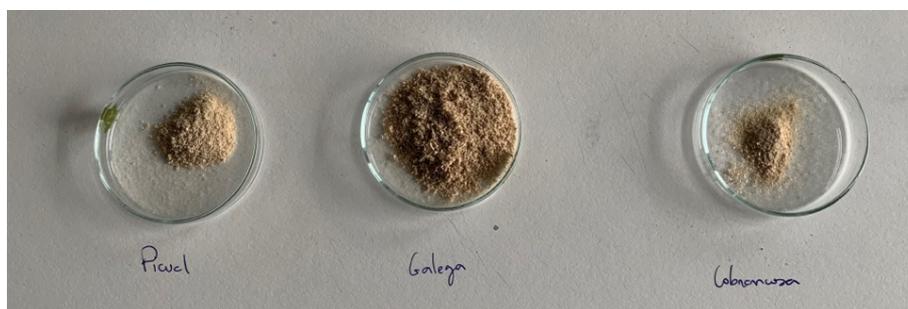


Figura 19 – Resíduo insolúvel em álcool (AIR): paredes celulares das folhas.

4.3.2. Extração das paredes celulares dos frutos

Para a determinação da fração das paredes celulares dos frutos (AIR), procedeu-se à extração do endocarpo seguida da liofilização da polpa congelada. Em seguida, moeu-se a amostra e desengordurou-se através do método da determinação da gordura bruta, utilizando o Soxtherm Multistat SX PC utilizando éter de petróleo. Sendo a azeitona um fruto que contém na polpa um teor de gordura elevado, foi necessário previamente otimizar uma metodologia de extração das paredes celulares. Assim, cada amostra desengordurada foi sujeita a uma lavagem, com água destilada, para extração dos

sólidos solúveis da polpa dos frutos que não foram removidos pelo solvente orgânico; posteriormente a amostra foi filtrada e o sobrenadante foi processado do mesmo modo que para as folhas. Resumidamente: às amostras desengorduradas e lavadas foram adicionados 100 ml de etanol absoluto, levou-se à ebulição e no final foram lavadas com éter dietílico para remoção de pigmentos e desidratação do material. A amostra foi processada da mesma forma das folhas. No final a amostra foi seca e pesada quantificando-se desta forma o resíduo insolúvel em álcool (AIR dos frutos, Figura 20).



Figura 20 – Resíduo insolúvel em álcool (AIR): paredes celulares dos frutos.

4.3.3. Análise do teor de cálcio presente no material vegetal

Para a análise do teor de cálcio dos diferentes tipos de material vegetal (matéria seca das folhas, parede celular das folhas e dos frutos) pesaram-se 0,2 g que foram levados à mufla a 500°C e por digestão ácida das cinzas com ácido clorídrico a 0,5 N, determinou-se por espectrofotometria de absorção atômica (Perkin Elmer AAnalyst 400) o teor de cálcio de cada amostra. Os resultados foram expressos em mg de cálcio por g/material vegetal (Figura 21).

O que se pretende, foi confirmar se os lotes de frutos mais tempo assintomáticos das diferentes aplicações, tinham maior concentração de cálcio nas células da parede celular e se os lotes de frutos sintomáticos, sem nenhuma aplicação, tinham menor concentração de cálcio.

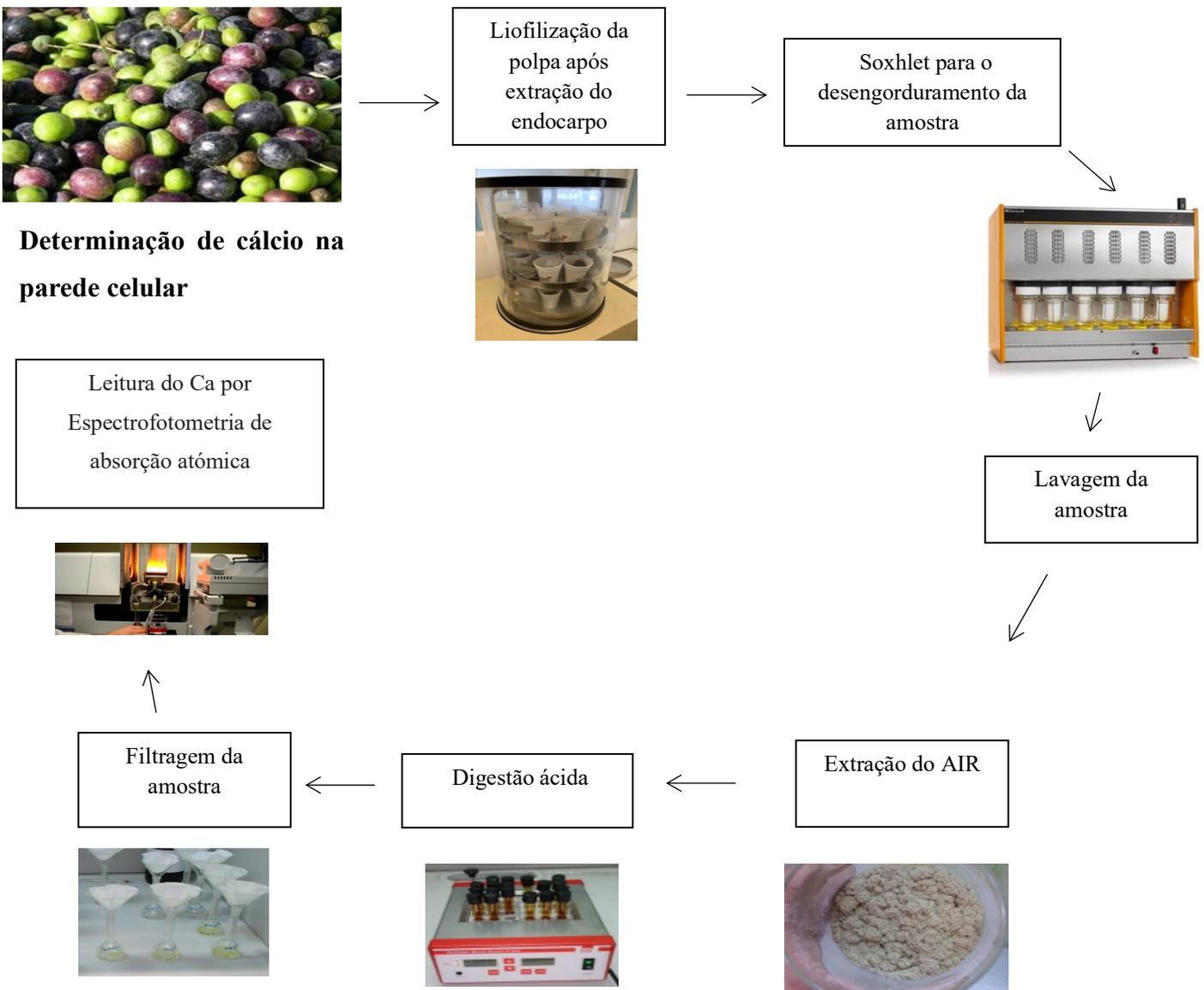


Figura 21 – Processo da digestão ácida dos frutos e folhas.

4.3.4. Determinação da área foliar

Para a determinação da área foliar foram efetuadas fotografias previamente à determinação do peso seco referido anteriormente. Para o efeito, as folhas de cada repetição foram colocadas de baixo de um vidro, de forma a aplanar o limbo (em algumas folhas parcialmente encurvado). Depois foram fotografadas junto com uma régua (escala) e a determinação da área foliar foi feita recorrendo ao programa Imagej (National Institutes of Health, USA). Cada lote fotografado foi determinado e calculado o peso seco. Conhecendo a área foliar e peso seco de cada lote de folhas, calculou-se a área específica foliar (SLA – specific leaf area) em m², folha por Kg de peso seco.

4.4. Análise estatística

Para o tratamento estatístico foi utilizado o software Statistica versão 7.0 (StatSoft, Inc.). Efetuou-se uma análise de variância com nível de significância de 0.05. O delineamento foi um fatorial 3 x 3 (três cultivares e três níveis de aplicação de formiato de cálcio) com três repetições.

5. Resultados e Discussão

A antracnose da oliveira é a doença que afeta o olival mais temida pelos olivicultores. Está muito presente em todos os países produtores de azeitona e em que Portugal não é exceção, principalmente nas regiões onde a cultivar 'Galega Vulgar' tem uma expressão elevada, já que, como referido anteriormente, a maturação plena dos frutos desta cultivar coincide com a altura em que as temperaturas e humidade relativas são as mais adequadas às exigências de *Colletotrichum* spp., sendo bastante suscetível à doença (Talhinhas, *et al.*, 2011). No entanto, esta patologia vegetal, afeta sobretudo os olivais em anos húmidos e com temperaturas amenas, causando elevados prejuízos (Trapero *et al.*, 2019). Numa tentativa de se passar a reduzir a utilização de fungicidas de síntese química utilizados no controlo da antracnose, neste trabalho testou-se uma forma alternativa de proteção, utilizando o macronutriente cálcio em adubação foliar como forma de fortalecer as paredes celulares dos frutos e diminuir a entrada do fungo *Colletotrichum* spp.. 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).

5.1. Detecção das formas latentes

Nos frutos testados em cada tratamento, não foram observadas sintomatologias de antracnose (Figura 22). Estes resultados permitiram demonstrar que não havia formas latentes, presentes no interior dos frutos tal como observado por Materatski *et al.*, (2018). De igual modo, outros autores verificaram a eficiência de desinfeção dos frutos (Moral *et al.*, 2009). Assim, torna-se mais seguro que as infeções que aparecessem posteriormente nas inoculações realizadas neste estudo seriam apenas resultantes das infeções induzidas experimentalmente.



Figura 22 – Observação de infeções latentes

5.2. Resultados da inoculação dos frutos das três variedades

Como se pode observar na Figura 23, embora não se observem diferenças significativas (anexo A), verificou-se um número inferior de frutos infetados na cultivar 'Galega vulgar' em comparação com as outras duas cultivares. Na cultivar 'Galega vulgar' comparando a testemunha com os outros dois grupos, verificou-se haver uma menor incidência de frutos infetados nos grupos sujeitos às aplicações de cálcio. Isto está em clara contradição com a maioria dos trabalhos na área. De facto, noutros trabalhos efetuados com estas cultivares (Gomes *et al.*, 2012), verificaram que a cultivar 'Galega vulgar' é mais suscetível à ação deste agente patogénico por ter uma cutícula mais fina em comparação com as cultivares 'Picual' e 'Cobrançosa'. De facto, a cutícula menos espessa observada por Gomes *et al.*, (2012) em 'Galega vulgar' e em dois anos consecutivos, justifica uma maior suscetibilidade desta variedade à ação do fungo.

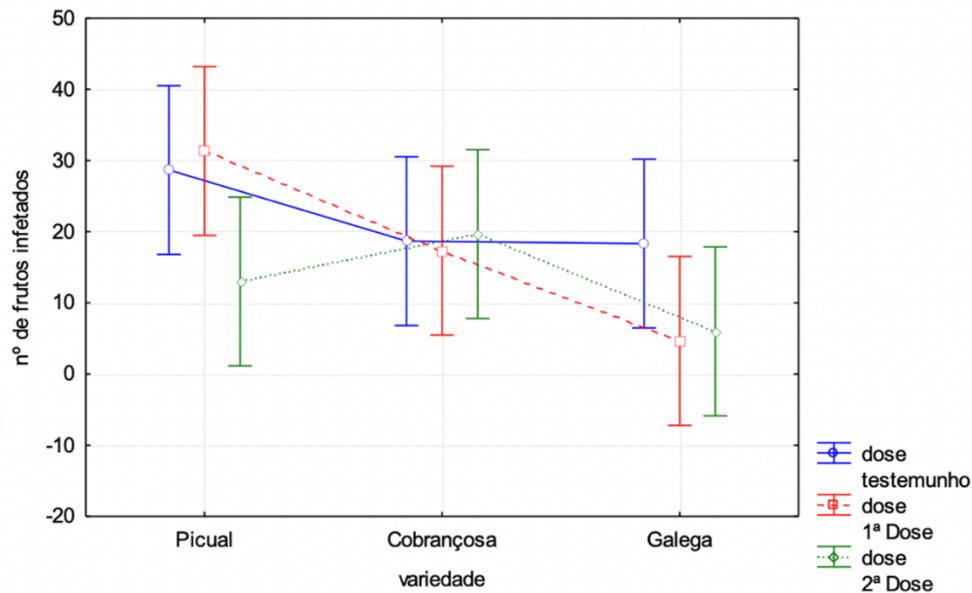


Figura 23 – Número de frutos infetados por dose e variedade ao fim de 12 dias (Representação gráfica de intervalos calculados com 95% de confiança para as médias dos grupos avaliados com N=3).

Com efeito, é do conhecimento geral que a cultivar ‘Galega vulgar’ é das cultivares mais suscetíveis à gafa. No entanto esta suscetibilidade pode justificar-se com o facto do período de maturação da galega coincidir com as condições de temperatura e humidade que favorecem as infeções por *Colletotrichum* spp. A constatação, feita por alguns autores da presença de uma cutícula mais fina na cultivar ‘Galega vulgar’, contribui para a opinião geral relativamente à maior suscetibilidade desta variedade à antracnose (Gomes *et al.*, 2012).

Neste trabalho optou-se por fazer as inoculações com *Colletotrichum acutatum* na mesma fase de maturação nas três variedades, o que não corresponde a uma situação real, já que o processo foi realizado em laboratório e em atmosfera controlada. Também é nesta fase que a cultivar ‘Galega vulgar’ apresentar maior quantidade de compostos fenólicos na maturação em comparação com as outras duas variedades. De facto, outros autores verificaram que a cultivar ‘Galega vulgar’ em comparação com a cultivar ‘Cobrançosa’ apresentava, na maturação um teor de compostos fenólicos maior (Peres *et al.*, 2016). Vários relatos afirmam que, a maior concentração de compostos fenólicos em azeitonas verdes constitui um importante fator de resistência a agentes patogénicos (Arici *et al.*, 2014; Verghese *et al.*, 2012; Hamauzu & Yasunori, 2006). À medida que decorre a

maturação ocorre também uma diminuição geral dos compostos fenólicos e esse facto aumenta a suscetibilidade dos frutos ao *Colletotrichum* spp. (Gomes *et al.*, 2012).

Por outro lado, segundo os estudos realizados por Gomes, *et al.* (2012), a espessura da cutícula da cultivar 'Picual' mostrou ser significativamente superior à espessura da cutícula da cultivar Cobrançosa o que está em contradição com os resultados obtidos quanto ao número de frutos infetados que se verificou neste trabalho, em que o número de frutos infetados foi superior na cultivar 'Picual' em comparação com a cultivar 'Cobrançosa'. Estes resultados parecem indicar que a cutícula não é o único fator que condiciona a entrada dos fungos nos tecidos dos frutos.

5.3. Teores de cálcio presentes no AIR

Os trabalhos que recorrem à aplicação de cálcio aos frutos, com o intuito de aumentar a sua capacidade de conservação e qualidade, nem sempre demonstram a eficácia desta aplicação (Conway *et al.*, 2002). No entanto, a maioria dos trabalhos avalia o teor de cálcio total presente nos frutos o que pode conduzir a resultados contraditórios. Isto é, o cálcio nos frutos pode estar presente em diversas frações na célula além da parede celular e se avaliarmos apenas a presença do cálcio total nos frutos perde-se a informação do teor de cálcio que está associado à fração das paredes celulares. A informação do teor deste nutriente nas paredes celulares é muito importante porque é nesta fração que este macronutriente confere rigidez e resistência e, por conseguinte, aos frutos. Neste trabalho, a presença de cálcio na parede celular, após a aplicação de cálcio ao fruto, foi confirmada por análises posteriores, efetuadas diretamente à parede celular.

A degradação das paredes celulares é um processo normal, que ocorre durante a maturação dos frutos, consistindo em alterações desde o final do crescimento e desenvolvimento dos frutos até à senescência (Watada *et al.*, 1984).

Durante a maturação, há alterações da biossíntese de pigmentos e produção de compostos voláteis, sendo estas 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 & Bennett, 1991). A regulação da expansão e da dissolução da parede celular, assim como a modificação da lamela média, vai contribuindo para a sua degradação, possibilitando a entrada de fungos patogénicos nos frutos, através da epiderme (Fischer & Bennett, 1991).

Nachtigal & Nava (2010), referem que na cultivar de macieira Fuji, após a aplicação de cálcio por via foliar, verificou-se uma diminuição da incidência de distúrbios fisiológicos como o bitter pit.

O amolecimento dos tecidos da polpa dos frutos sugere a clivagem de ligações covalentes que unem as pectinas (Fisher & Bennet, 1991). O Ca^{2+} , liga-se às pectinas reforçando-as e dando estabilidade às paredes celulares (Brett & Waldron, 1996).

Na Figura 24 observam-se os valores dos teores de cálcio presentes nas paredes celulares das três variedades em estudo considerando os diferentes tratamentos a que foram sujeitas. Nota-se que a cultivar 'Galega vulgar' é a que apresenta maiores valores de cálcio nas paredes celulares em comparação com as outras cultivares, sendo a 'Picual' a cultivar com menores teores de cálcio. Observa-se também na maioria dos tratamentos valores crescentes de cálcio entre a dose simples e a dose dupla para a três cultivares. A grandeza observada na figura para os valores de cálcio nas paredes celulares estão de acordo com outros observados noutras drupas (Rato *et al.*, 2012)

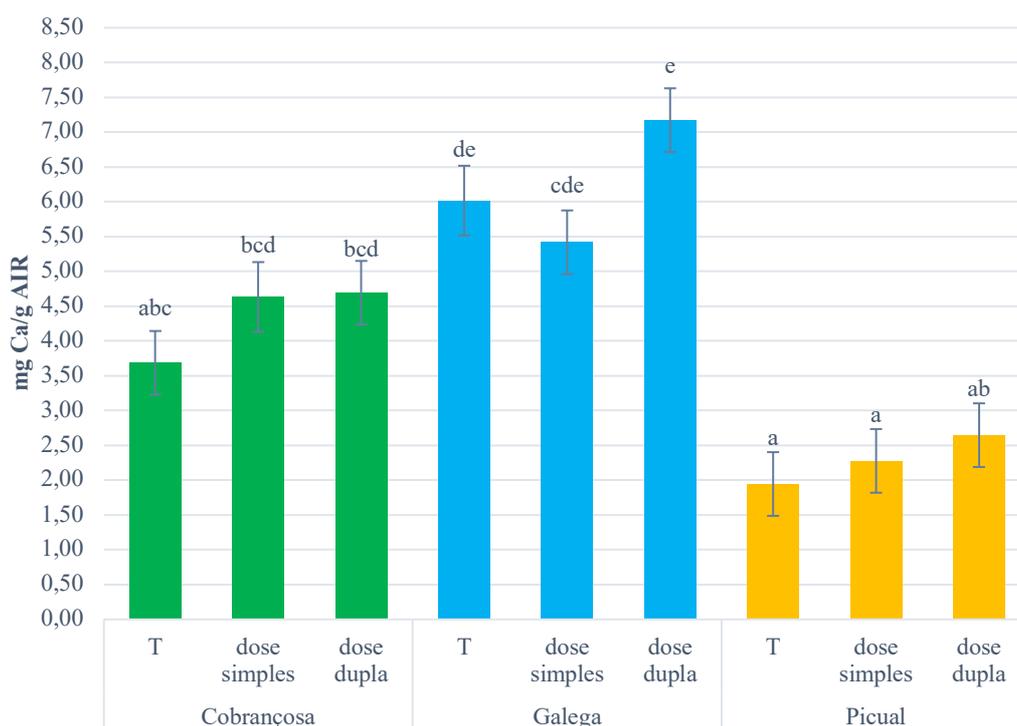


Figura 24 – Miligramas (mg) de cálcio por grama (g) de parede celular dos frutos nas diferentes variedades e tratamentos (Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes segundo o teste de Tukey com $p \leq 0,05$ e $N=3$)

Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Gomes *et al.* (2012), relativamente à espessura da camada epidérmica das três variedades ('Picual',

'Cobrançosa' e 'Galega vulgar'). Estes autores verificaram que na cultivar 'Galega vulgar', a espessura da cutícula era a menor das três. Este facto poderá ter contribuído para a presença de maiores teores de cálcio nos frutos já que a cutícula mais fina permitirá uma maior facilidade na passagem do cálcio através desta estrutura aquando das pulverizações foliares. Pela observação da Figura 24, verifica-se que a aplicação da dose dupla de cálcio na cultivar 'Galega vulgar' representou um acréscimo (embora estatisticamente não significativo) relativamente à dose simples, sendo, no entanto, este acréscimo muito pouco significativo nas outras duas variedades. Estes resultados estão coerentes com o observado relativamente à área específica foliar (Figura 25) em que quer a cultivar 'Galega vulgar' como a cultivar 'Picual' têm uma maior superfície específica em comparação com a cultivar 'Cobrançosa', embora estatisticamente não significativa (Anexo B) o que pode contribuir para uma maior facilidade de entrada do cálcio ao nível da folha. Estas observações vão ao encontro do trabalho de Fageria *et al.* (2009) que afirmam que o sucesso da adubação foliar, entre outros fatores, depende da área específica foliar.

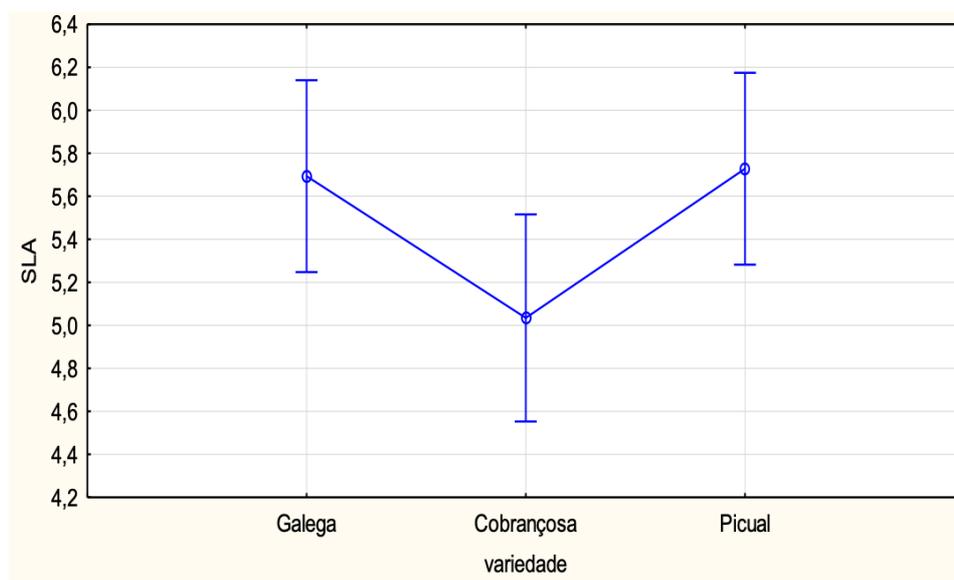


Figura 25 – Área específica foliar das três cultivares (Representação gráfica de intervalos calculados com 95% de confiança para as médias dos grupos avaliados com N=3).

A aplicação da dose dupla, na cultivar 'Cobrançosa', não mostrou, no teor de cálcio das paredes celulares dos frutos, valores significativamente diferentes da dose simples. Por outro lado, sendo a cultivar 'Picual', a variedade que maior espessura apresenta ao nível da cutícula, também foi a cultivar que menores teores de cálcio

apresentou ao nível das paredes celulares. A maior espessura desta estrutura parece contribuir para dificultar a passagem de cálcio através da cutícula. No entanto a aplicação de cálcio na dose dupla na cultivar 'Picual' resultou em frutos com maiores teores de cálcio embora não se observem diferenças significativas (Figura 24).

Segundo Faust (1989), com a formação do fruto, a concentração em cálcio vai decrescendo, o que, em cultivares com frutos de maior dimensão, como o caso das cultivares 'Picual' e 'Cobrançosa', haverá um efeito de diluição superior em comparação aos frutos mais pequenos. No entanto, estas relações só se conseguem constatar se forem feitos cortes histológicos para observar a constituição dos frutos relativamente ao número de células, o que não foi realizado neste trabalho.

É importante notar que o nível de cálcio das paredes celulares da testemunha nas três cultivares ('Galega vulgar', 'Picual' e 'Cobrançosa'), onde se verificaram os valores mais elevados foi na cultivar 'Galega vulgar' o que pode ser observado na Figura 24. É de referir ainda que o teor de cálcio quantificado nas paredes celulares, neste trabalho, é ligeiramente inferior ao observado por Caeiro em 2020, (Tabela 2), principalmente nos frutos sujeitos à dose dupla (Tabela 2). No entanto, a remoção da gordura da amostra e a extração das paredes celulares foram efetuadas seguindo um protocolo diferente do referido por Caeiro (2020), o que pode justificar estas diferenças.

Tabela 2 – Miligramas (mg) de cálcio por grama (g) de parede celular na polpa da azeitona da cultivar 'Galega vulgar' em amostras colhidas em 3 datas (Caeiro, 2020).

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

Concluimos assim, que a cultivar 'Galega vulgar' tem mais cálcio nas paredes celulares dos frutos em todos os tratamentos que as outras duas variedades em estudo, o que pode justificar também a menor suscetibilidade relativamente a *Colletotrichum*. Estes resultados estão coerentes com os resultados das infeções dos frutos (Figura 23), neste caso, é a cultivar 'Galega vulgar' que apresentou um menor número de infeções, o que está de acordo com os autores Engelsdorf *et al.* (2017), que referem que a resistência à

penetração de fungos na parede celular dos frutos, está dependente das ligações pécicas da parede. A ligação do cálcio às pectinas da parede celular irá reforçar as ligações das pectinas entre si nas paredes celulares dos frutos e aumentar a resistência à entrada de fungos para o interior dos frutos. Estes resultados estão de acordo com os autores Brett & Waldron, (1996) que referem que o catião cálcio tem uma relevância bastante conhecida na estabilidade das paredes celulares da epiderme dos frutos, fazendo um reforço das ligações das pectinas e dando consistência e resistência à epiderme dos frutos, contribuindo também para a menor incidência de acidentes fisiológicos. Desta forma, o cálcio contribuiu para o aumento da resistência das paredes celulares dos frutos porque se liga às pectinas.

Verificou-se também que não houve diferenças significativas entre variedades ao nível do rendimento das paredes celulares ($p=0,54$) (Figura 26A), isto é, as três variedades neste trabalho têm a mesma percentagem de paredes celulares (AIR) no fruto. De igual modo entre tratamentos também não se observaram diferenças significativas ($p=0,72$), (Figura 26B) ao nível do rendimento das paredes celulares.

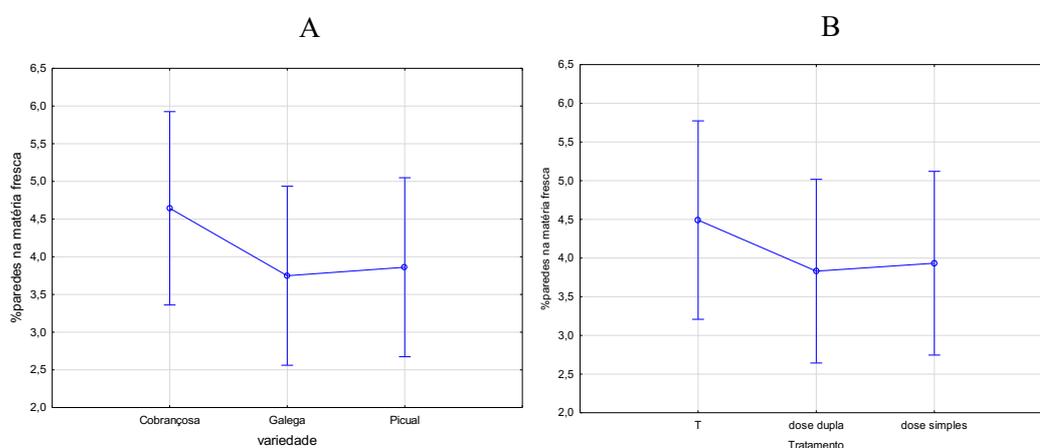


Figura 26 – Rendimento das paredes celulares (g de AIR/100 g de peso fresco): A) entre variedades; B) entre tratamentos (Representação gráfica de intervalos calculados com 95% de confiança para as médias dos grupos avaliados com N=3).

Pela observação da Figura 23, verifica-se que na cultivar 'Cobrançosa' os vários tratamentos efetuados não influenciaram a suscetibilidade desta variedade à infeção por *Colletotrichum acutatum*, da mesma forma que não se observam diferenças significativas no teor de cálcio dos frutos entre tratamentos, isto é: não houve diferenças na suscetibilidade à infeção por *Colletotrichum acutatum* entre os vários níveis de cálcio

aplicado, o que pode justificar-se pelo facto de a epiderme do fruto ser mais espessa (Gomes *et al.*, 2012) e o cálcio não conseguir alojar-se facilmente nas paredes celulares da epiderme do fruto.

Para a cultivar 'Picual', verificou-se que em todos os tratamentos, o número de frutos infetados, coincidiu com os baixos níveis de cálcio observados nas paredes celulares desta cultivar. Apesar desta cultivar ser referida frequentemente como sendo menos suscetível á antracnose (Gomes *et al.*, 2012) e de ter a cutícula mais espessa, neste trabalho verificou-se ser a cultivar mais suscetível, facto que pode ter resultado das inoculações terem sido efetuadas no mesmo estado de maturação para todas as cultivares. Além deste aspeto, os autores Gouvinhas & Barros (2020), referem que esta cultivar reage de um modo diferente à aplicação foliar de cálcio, originando uma diminuição da atividade antioxidante ficando desta forma mais suscetível aos ataques de *Colletotrichum* spp., facto que foi observado neste trabalho. Correlacionando o elevado número de frutos infetados na cultivar 'Picual', os baixos níveis de cálcio presentes nas paredes celulares dos frutos e o efeito verificado nos frutos com origem na adubação foliar, estas justificações parecem contribuir, em conjunto, para o maior número de frutos infetados na cultivar 'Picual'.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho conseguiu-se quantificar e avaliar o efeito das aplicações de cálcio, durante vários períodos de formação do fruto, nas cultivares 'Galega vulgar', 'Cobrançosa' e 'Picual' com o principal objetivo de dificultar a entrada do fungo *Colletotrichum acutatum*. Na cultivar 'Galega vulgar', observou-se um menor número de frutos infetados e ao mesmo tempo maiores teores de cálcio nas paredes celulares dos frutos comparando com as outras duas cultivares em estudo. Este facto vem confirmar o observado por outros autores em diversos tipos de fruto, de que a aplicação faseada de cálcio, durante a formação do fruto torna a cutícula dos mesmos mais resistente à entrada de fungos, logo menos suscetível ao *Colletotrichum acutatum*, permanecendo a constituição das paredes celulares intactas durante um maior período de tempo, principalmente com a aplicação feita na dose dupla.

Pode-se concluir que, apesar do historial da cultivar 'Galega vulgar' a apontar como bastante suscetível à antracnose, verificou-se que o problema principal está no facto de a maturação do fruto coincidir com a altura em que as condições climáticas são mais favoráveis à infeção por *Colletotrichum* spp..

A cultivar 'Galega vulgar' é caracterizada por apresentar cutícula mais fina (Gomes *et al.*, 2012) e, dessa forma, é das três cultivares em estudo, a que reage em conformidade com a adubação foliar, obtendo a maior presença do catião cálcio nas paredes celulares dos frutos.

Neste trabalho, analisou-se os dados relativos à quantidade de cálcio presente nas paredes celulares e não o cálcio total, já que este último não é indicador da maior presença deste catião nas paredes celulares. É o cálcio presente nas paredes celulares que confere resistência a esta estrutura que é importante para atrasar a entrada do fungo *Colletotrichum acutatum* nos frutos.

Os fungos, como é de conhecimento geral afetam não só os olivais, mas a agricultura em todo o mundo, causando grandes prejuízos a nível global. Em pleno século XXI, para o controle de muitos fungos que atacam a cultura do olival, recorre-se à aplicação de cobre, sendo a principal substância ativa usada para controlar o *Colletotrichum*. Atuando o cobre por contacto, a sua aplicação de cobre deverá ser feita apenas na fase de infeção, logo após a infeção já estar instalada, o que torna este processo menos efetivo. Sendo o cobre um produto que atua por contacto apresenta enormes perdas por lavagem, através da pluviosidade logo depois das aplicações. Quer-se com isto dizer,

que o uso excessivo destes produtos químicos, tem causado poluição no meio ambiente com grande impacto ao nível dos lençóis freáticos, podendo desta forma entrar nas cadeias alimentares para além de contribuir para o aparecimento de fenómenos de resistência a vários organismos patogénicos.

Tendo em conta todos estes contras da poluição ambiental, é necessário pesquisar outros processos de defesa e proteção das plantas, que sejam menos problemáticos para o ambiente e para a saúde pública. Nesse contexto, será importante contribuir para uma nutrição equilibrada das plantas utilizando produtos como neste caso o formiato de cálcio que reforçam as paredes celulares dos frutos e, portanto, podem ser uma alternativa viável e economicamente interessante no combate aos agentes fitopatogénicos.

No futuro seria interessante estender este estudo a outras variedades para perceber se haverá benefício na utilização deste tipo de produtos no combate à antracnose bem como avaliar quais as épocas de aplicação que serão mais eficazes para a absorção de cálcio pelo fruto.

Bibliografia

- Agustí, M. (2004). *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 493 pp.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology, 5ª Edition, Department of Plant Pathology, University of Florida, USA, 952p.*
- Alcobia, M. D. & Ribeiro, J. R. 2001. Manual do Olival em Agricultura Biológica. 1ª Edição. Edição Terra Sã, Alijó, 111p.
- Amaro, P.T. (1997). Algumas doenças da oliveira. Direção-Geral de Proteção das Culturas. Lisboa. 19p.
- Anónimo, s/d. El cultivo del olivo (Apartados del I.7.2. al III.2), <http://canales.laverdad.es/canalagro/datos/olivo/olivo3.htm>.
- Arici, S. E., Kafkas, E., Kaymak, S., Koc, N. K. (2014). *Phenolic compounds of apple cultivars resistant or susceptible to Venturia inaequalis*. *Pharmaceutical Biology*, 52(7), 904–908.
- 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
- Barranco, D., 2008. Variedades y patrones. In: Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo L. (Eds.), *El cultivo del olivo, sixth ed. Ed. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, Spain*, pp. 63–92.
- Barros, F. E. N. (2011). *Caracterização da fenologia de quatro cultivares de Oliveira (Olea Europaea L.): 'Arbequina', 'Cobrançosa', 'Galega' e 'Picual', qualidade da flor e do pólen numa perspetiva de modelação*. 1–89.
- Bohm, J., Gouveia, J. (2013). *Preâmbulo. O Grande Livro da Oliveira e do Azeite*. Dinalivro, Lisboa, p. 24-25.
- Branco, V. (2016). *Avaliação da uniformidade da rega e da fertirrega num olival superintensivo*.
- Brett, C. T., Waldron, K. W. (1996). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. eBook.

- Brown, Patrick H, Fernández, V. (2015). *Fertilización Foliar : Principios Científicos y Prácticas de Campo*
- Cabral, E. (2009). *Estudos preliminares de polinização em oliveira (Olea europeae L.) cv. Galega vulgar*. Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.
- Caeiro, L. (2020). *Estudo dos efeitos da suplementação em cálcio, na cultivar Galega vulgar, para a proteção contra a antracnose da azeitona*. Universidade de Évora.
- Cacciola, S., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo, G. (2012). *Olive Anthracnose*. *Journal of Plant Pathology*, p. 29- 44.
- Cardoso, J. (1965). *Os Solos de Portugal a Sul do rio Tejo. Direção Geral dos Serviços Agrícolas*, Lisboa, p.161- 234.
- Cantero, F. de A. (1997). *Enfermedades y Plagas del olivo. 3ª ed. Riquelme y Vargas Ediciones*, S.L.. Jaén, 646p.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. (2008). *The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to Botrytis cinerea*. *Proc Natl Acad Sci*. 105(3), 859–864.
- Carvalho M.T., Simões-Lopes P., Monteiro da Silva M.J. (2008). Influence of Different Olive Infection Rates of *Colletotrichum acutatum* on Some Important Olive Oil Chemical Parameters. *Acta Horticulturae* 791:555-558.
- Carvalho M.T., Simões-Lopes P., Monteiro da Silva M.J. (2004). Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* in some important olive oil chemical parameters. 5th International Symposium on olive growing. Izmir, Turkiye, 27 September-2 October: 57.
- Casa do Azeite, (2020). Dados do setor e da produção. Produção de azeite em Portugal. Disponível em: <http://www.casadoazeite.pt/Profissionais/Dados-sector>. Acedido em: 18 de Maio de 2020.
- 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., Kelman, A., (1990). *Enhancing the Natural Resistance of Plant Tissues to Postharvest Diseases through Calcium Applications*, 751-754.

- Cordeiro, A. M., (2014). *Exigências edafoclimáticas da oliveira*. In: *Boas práticas no olival e no lagar*. Coordenador Jordão, P. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. 290 pp.
- Cordeiro, A. (2016). *Índice de maturação da variedade “Galega Vulgar”*. Revista Vida Rural, 1817: 34-35.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woundenberg, J.H.C.Crous, P.W. (2012) – *The Colletotrichum acutatum species complex*. Studies in Mycology, vol. 73, n. 1, p. 27-113.
- Engelsdorf, T., Will, C., Hofmann, J., Schmitt, C., Merritt, B. B., Rieger, L., Frenger, M. S., Marschall, A., Franke, R. B., Pattathil, S., & Voll, L. M. (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, 68(3), 701–713.
- Eskin, N.A. (1990). Biochemistry of foods 2nd edition. Science direct, 27: 319- 330.
- Fageria, N. K., Filho, M. P. B., Moreira, A., & Guimarães, C. M. (2009). *Foliar fertilization of crop plants*. Journal of Plant Nutrition, 32(6), 1044–1064.
- Feio, M. (1991). *Clima e agricultura: exigências climáticas das principais culturas e potencialidades agrícolas do nosso clima*. Ministério da agricultura, Pesca e Alimentação, Direção Geral de Planeamento. Agricultura, Lisboa, 266p.
- Félix, M., Clara, M. (2007). *A Gafa*. In: *Manual de Proteção Integrada do Olival*. Torres, L. João Azevedo Editor, p. 220-229.
- Ferguson, I. B. e Drobak, B. K. (1988). *Calcium and the regulation of plant growth and senescence*. HortScience, 23: 262-266
- Fischer, R. L. e Bennett, A. B. (1991). *Role of cell wall hydrolases in fruit ripening*. Annu. Rev. PlantPhysiol, 42: 675-703.
- García, A. (2005). *O Cultivo Moderno do Olival*. Publicações Europa- América, Mem Martins, p. 296.
- Garcia, F., & Cosialls, J.R. 1995. *Primeras obsercaciones de la lepra de la aceituna em cv “arbequina” y “verdiell” em las comarcas de Lleida*. I simposi de l’olivera Arbequina a Catalunya. Les Borges Blanques, 9-10 de Novembre: 55-56.

- Goldberg, R., Lê, T., & Catesson, A. M. (1985). *Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis*. *Journal of Experimental Botany*, 36(3), 503–510.
- Gómez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A.M., Capell, T., Christou, P., 2010, *Critical evaluation of strategies for mineral fortification os staple food crops*. *Transgenic Res.* 19, 165-180.
- Gomes, Sonia, Bacelar, E., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., & Guedes-Pinto, H. (2012). *Infection Process of Olive Fruits by Colletotrichum acutatum and the Protective Role of the Cuticle and Epidermis*. *Journal of Agricultural Science*, 4(2), 101–110.
- Gomes, S., Prieto, P., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Martin, A., & Guedes-Pinto, H. (2009). *Development of Colletotrichum acutatum on tolerant and susceptible Olea europaea L. cultivars: A microscopic analysis*. *Mycopathologia*, 168(4), 203–211.
- Google Earth (2020). <https://www.google.com>
- Goulao, L.F., Almeida, D.P., Oliveira, C.M. 2010. *Effect of enzymatic reactions on texture of fruits and vegetables*. In: *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications* (Ed.: A. Bayindirli). CRC Press, USA.
- Gouvinhas, I., & Barros, A. I. (2020). *Effect of Foliar Pre-Harvest Calcium Application on the Mineral and Phytochemical Composition of Olive Oils*. *Proceedings*, 70(1), 66.
- Graniti A., Frisullo S., Penissi A., Magnano L. (1993). *Infections of Glomerella cingulata on olive in Italy*. *EPPO Bull*, 23: 457-465.
- Hamazu, Yasunori. (2006). *Role and evolution of fruit phenolic compounds during ripening*. *Stewart Postharvest Review*. 2. 1-7.
- Hématy, K., Cherk, C., Somerville, S. Host (2009) – *Pathogen warfare at the plant cell wall*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 406–413.
- Hanson, E.J.; Beggs, J.L.; Beaudry, R.M. *Applying calcium chloride postharvest to improve highbush blueberry firmness*. *HortScience*, Alexandria, v.28, n.10, 1993.
- INE (2020). *Estatísticas Agrícolas 2019*. Lisboa

- Jarvis, M. C. (1982). *The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls*. *Planta*, 154(4), 344–346.
- Jarvis, M. C., Hall, M. A., Threlfall, D. R., & Friend, J. (1981). *The polysaccharide structure of potato cell walls: Chemical fractionation*. *Planta*, 152(2), 93–100.
- Lavee, S. (1996). *Biología y fisiología del olivo*. In: Enciclopedia mundial del olivo, 1ª edição. pp: 60-110. COI (Conselho Oleícola Internacional), Madrid. ISBN: 84-01-61877-0.
- LOA – The Olive World. A História da Oliveira. Disponível em: <https://www.loa.pt/a-historia>. Acedido em: 2 de Dezembro de 2019.
- Lousser, R.; Brousse, G. (1980) *El olivo*. Ediciones Mundi – Prensa, Madrid. 533p.
- Faust, M. (1989). *Physiology of temperate zone fruit trees*. John Wiley & Sons, Bestville, Maryland.
- Leitão, F., Potes, M., Calado, M. e Almeida, F. (1986). *Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal*. MADA- Direção Geral de Planeamento e Agricultura. Lisboa, p.17-104.
- Lima, D.U., Santos, H.P., Tiné, M.A., Molle, F.R.D., Buckeridge, M.S. 2001. *Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane*. *Gen Mol Biol*, 24 (1-4), 191-198.
- 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.
- Kadir, S.A., 2005. *Fruit Quality at Harvest of “Jonathan” Apple Treated with Foliarly-Applied Calcium Chloride*. *J. Plant Nutr.* 27, 1991-2006.
- Klaus, B. *Cálcio nos solos e nas plantas*. *Research Centre Hanninghof, Yara International*, Alemanha. Informações agronomicas. N. 117, 2007.
- Malavolta, E. *Manual de nutrição de plantas*. Piracicaba: Livroceres, 2006. 638 p.
- 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.

- Matos, N. Nutrição Cálcica - Uma mais-valia em pomóideas. Lusosem, S.A. Disponível em: <https://www.lusosem.pt/noticias/nutricao-calcica-uma-mais-valia-em-pomoideas>. Acedido em: 28 de Maio de 2020.
- Martín, M. & García-Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. Eur. J. Plant Pathol. 105: 733-741.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Elsevier Science Publishing, v.78.
- Macneil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P. (1984). *Structure and function of the primary cell walls of plants*. Annu Rev Biochem, Palo Alto, 53, 625-663.
- Miranda, P. (2001). *Meteorologia e Ambiente*. Universidade Aberta, Lisboa, pp. 321.
- Milheiro, A. V. (1992). *A Cultura da Oliveira em Portugal*. Gazeta das Aldeias nº 2991, 97: 23-26.
- Moral, J.; Oliveira, R.; Trapero, A. (2009). *Elucidation of the Disease Cycle of Olive Anthracnose caused by Colletotrichum acutatum*. Phytopathology, p. 548-56.
- Moral, J., Xaviér, C. J., Viruega, J. R., Roca, L. F., Caballero, J., & Trapero, A. (2017). *Variability in susceptibility to anthracnose in the world collection of olive cultivars of Cordoba (Spain)*. Frontiers in Plant Science, 8 (November), 1–11.
- Nachtigall, G.R.; Nava, G. (2010). *Adubação foliar: fatos e mitos*. Agropecuária Catarinense, Florianópolis, v. 23, n. 2, p. 87-97,.
- Natale, W.; Prado, R.M.; Moro F.V (2005). *Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular de frutos de goiabeira*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.40, n.12.
- Natale, W., (2009). *Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular dos frutos de goiabeira*. Brasília, 40: 1239-1242.
- Oliveira, R. e Trapero, A. (2001). Effect of temperature on species of *Colletotrichum* causing olive anthracnose. 11th Congresso of the Mediterranean Phytopathological Union na 3rd Congresso the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Évora
- Oteros, J. (2014). Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo.

- Paiva, E.; Lima, M.S.; Paixão, J.A. (2009) Pectina: *Propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação*. Revista Iberoamericana de Polímero.
- Pérez, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E. e Correl, J. C. (2005). *Lifestyles of Colletotrichum acutatum*. Plant Disease.
- Peres, F., Martins, L. L., Mourato, M., Vitorino, C., Antunes, P., & Ferreira-Dias, S. (2016). *Phenolic compounds of 'Galega Vulgar' and 'Cobrançosa' olive oils along early ripening stages*. Food Chemistry, 211, 51–58.
- Pooaiaha, B. W. (1988). *Molecular cellular aspects of calcium action in plants*. HortScience, 2: 267- 271.
- Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, M.J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.C., Hahn, M.C.1994. *Ceneration of Monoclonal Antibodies against Plant Cell-Wall Polysaccharides*. Plant Physiol. 104, 699-710
- Rallo L. 1999. Miglioramento delle risorse genetiche. In Proceedings of the international seminar on scientific innovation and their application in olive growing and elaiotechnique. 10-12 March 1999, Firenze. Pp. 1-28.
- Rallo, L. & Martin, G.C. 1991. *The role of chilling in releasing olive floral buds from dormancy*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116, 1058-1062.
- Rallo, L. (2005). Antecedentes y Presentación: uma aproximación cronológica in: *Variedades de Olivo em Espanha*. Junta da Andalucía, MAPA, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 17-29.
- Rato, A. (2008). *Comportamento pós-colheita da ameixa 'Rainha Cláudia Verde' Prunus domestica L. – Efeitos do cálcio na maturação*. Repositório da Universidade de Évora.
- Rato, A. (2009). Comportamento pós-colheita da “Ameixa Rainha Cláudia Verde”.Évora. BGUE- Colégio da Mitra, 169424: 162.
- Rato, A. E., Nunes, C., Agulheiro-Santos, A. C., Barroso, J. M., Riquelme, F., & Coimbra, M. A. (2012). *Influence of cell wall calcium content in fruit firmness during the ripening of plums (Prunus domestica L.)*. Acta Horticulturae, 934, 1047–1054.
- Rodrigues, F. M. (2014). Apontamentos de Olivicultura. ESAE, Elvas.

- Rolle, R.; Chism, G.W. *Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables*. Journal of Food Quality, Oxford, v.10, 1987.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. (1992) *Plant Physiology, Hormones and Plant Regulators: Auxins and Gibberellins*. 4th Edition, Wadsworth Publishing, Belmont, 357-381.
- Sasidharan, R., Voeselek, L.A, Pierik, R. 2011. *Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses*. Crit. Rev. Plant Sci. 30(6), 548-562.
- Sobreiro, J.B. 1993. *Guia para a protecção fitossanitária da oliveira*. Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar. Centro Nacional de Protecção da Produção Agrícola. Lisboa, 55 pp.
- Sousa, A., Pereira, J.A. Casal, S., Oliveira, B. e Bento, A. (2005). *Effect of the olive fruitfly and the olive anthracnose on oil quality of some Portuguese cultivars*. 2nd European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group “Integrated Protection of Olive Crops”. Florence, Italy, v. 30.
- Sreenivasaprasad, S., & Talhinhos, P. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology, 6(4), 361–378.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2004. Plant Physiology, Third Edition. Porto Alegre.
- Talhinhos 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.
- Talhinhos P, Gonçalves E, Sreenivasaprasad S and Oliveira, H. (2015). Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* & *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. Eur J. Plant Pathol, 142: 73-83.
- Talhinhos, P., Mota-Capitão, C., Martins, S., Ramos, A. P., Neves-Martins, J., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., Silva, M. C., Sreenivasaprasad, S., & Oliveira, H. (2011). Epidemiology, histopathology, and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. Plant Pathology, 60(3), 483–495.

- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp: 82 - 690.
- Todolivo (2010). *Olival em Sebe*. Cordova, España.
- Todolivo (2020). *Olival em Sebe. Variedades*. Disponível em: <https://www.todolivo.com/pt-pt/olival-em-sebe/que-variedades-plantar>. Acedido em: 24 de Novembro de 2020
- Tous, J., Romero, A. & Plana, J. (1998). *Comportamiento agronómico y comercial de cinco variedades de olivo en Tarragona*. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 13 (1-2): 97-109.
- 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.
- Trapero, A., Blanco, M.A. Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. e Rallo, L. (2004). *Enfermedades. El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, p. 557-614.
- 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.
- Villarreal, M.R. 2007. A section of the cell wall in a plant cell.
- Verghese, A., Soumya, C., Shivashankar, S., Manivannan, S., & Krishnamurthy, S. (2012). *Phenolics as chemical barriers to female fruit fly, Bactrocera dorsalis (Hendel) in mango*. *Current Science*, 103(5), 563-566.
- 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.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). *The Colletotrichum gloeosporioides species complex*. *Studies in Mycology*, 73, 115–180.
- White, P.J., Broadley, M.R., 2003. Calcium in Plants. *Ann. Bot.* 92, 487-511.
- Wittwer, S. H., & Teubner, F. G. (1959). Foliar Absorption of Mineral Nutrients. *Annual Review of Plant Physiology*, 10(1), 13–30.

Wójcik, P. *Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization (Review)*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, Skierniewice, v.12, p. 201-208. 2004.

Yamamoto, E. L. M., Ferreira, R. M. A., Fernandes, P. L. O., Albuquerque, L. B., & Alves, E. O. (2011). Função do cálcio na parede celular vegetal de frutos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 6(2), 49–55.

Anexos

Anexo A - Testes pos-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$) para número de frutos infetados

Cell No.	Tukey HSD test: variable nº de frutos infetados (estatística coletiva) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 95,593 df = 18,000										
	Variedade	Dose	{1} 28,667	{2} 31,333	{3} 13,000	{4} 18,667	{5} 17,333	{6} 19,667	{7} 18,333	{8} 4,6667	{9} 6,0000
1	Picual	testemunho		0,999993	0,584422	0,932754	0,876114	0,961883	0,920526	0,127322	0,170472
2	Picual	1ª Dose	0,999993		0,392468	0,800007	0,708894	0,858794	0,778399	0,068669	0,093977
3	Picual	2ª Dose	0,584422	0,392468		0,997988	0,999707	0,993923	0,998695	0,975496	0,991647
4	Cobrancosa	testemunho	0,932754	0,800007	0,997988		1,000000	1,000000	1,000000	0,708894	0,800007
5	Cobrancosa	1ª Dose	0,876114	0,708894	0,999707	1,000000		0,999997	1,000000	0,800007	0,876114
6	Cobrancosa	2ª Dose	0,961883	0,858794	0,993923	1,000000	0,999997		1,000000	0,634801	0,732732
7	Galega vulgar	testemunho	0,920526	0,778399	0,998695	1,000000	1,000000	1,000000		0,732732	0,820667
8	Galega vulgar	1ª Dose	0,127322	0,068669	0,975496	0,708894	0,800007	0,634801	0,732732		1,000000
9	Galega vulgar	2ª Dose	0,170472	0,093977	0,991647	0,800007	0,876114	0,732732	0,820667	1,000000	

Anexo B – Testes pos-hoc de Tukey ($p < 0,05$) para área específica foliar

Tukey HSD test; variable SLA (Áreas Foliaras) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,40191, df = 17,000				
Cell No.	Cultivar	{1}	{2}	{3}
		5,6937	5,0135	5,7283
	Galega vulgar		0,098503	0,992730
	Cobrançosa	0,098503		0,080073
	Picual	0,992730	0,080073	