



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Identificação de genes potencialmente envolvidos na
resposta da oliveira à infeção por *Colletotrichum* sp.**

Diogo Inácio

Orientador(es) | Maria Doroteia Campos
Maria do Rosário Félix

Évora 2023





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Identificação de genes potencialmente envolvidos na
resposta da oliveira à infeção por *Colletotrichum* sp.**

Diogo Inácio

Orientador(es) | **Maria Doroteia Campos**

Maria do Rosário Félix

Évora 2023



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

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Carla Marisa Reis Varanda (Instituto Politécnico de Santarém - Escola Superior Agrária de Santarém) (Arguente)
Maria Doroteia Campos (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Não poderia começar esta dissertação sem primeiro prestar uma palavra de agradecimento a toda a gente que tornou possível a realização desta dissertação.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras, professora Maria Doroteia Campos e professora Maria do Rosário Félix por me apoiarem no momento difícil em que me encontrava antes de dar início ao projeto, à constante disponibilidade, apoio prestado e conhecimento transmitido.

Gostaria de dar uma palavra de apreço a todo o pessoal do Departamento de Fitotecnia porque de uma maneira ou de outra também contribuíram para que este projeto chegasse a bom porto.

Aos meus pais, avós e irmã que me permitiram estudar nesta grande instituição, sempre apoiaram toda a minha vida e sem eles nunca conseguiria ter terminado este projeto.

Quero agradecer à minha namorada Inês, que sempre me apoiou, motivou, ouviu muitos desabafos e esteve sempre comigo mesmo quando os tempos foram difíceis, sem ela este projeto não teria chegado ao fim.

Quero agradecer também aos meus amigos que me acompanharam durante todo o meu percurso académico.

Agradeço à Universidade de Évora e a todos os seus docentes por tudo o que me ensinaram, que me ajudou diretamente ou indiretamente a completar esta etapa.

Por último, agradecer a uma pessoa que me viu entrar na Universidade e que agora me vê do céu a sair, ao meu avô Alexandre, que pela sua influência segui esta área que tanto gosto e todos os dias me apaixona.

Resumo

A infecção pelo fungo *Colletotrichum* spp. causador da antracnose na cultura da oliveira (*Olea europaea*) na cultivar ‘Galega vulgar’, representa uma ameaça para a produção de azeitona e na qualidade dos azeites. Neste trabalho um dos principais focos foi a análise de genes que codificam as espécies reativas ao oxigênio (ROS) na oliveira durante a interação com o fungo. A investigação revelou que vários genes estão potencialmente relacionados à resposta ao stress oxidativo, estando ativamente envolvidos na defesa da oliveira contra a infecção por este fungo. Entre esses genes, o *Endochitinase EP3-like (CH11)* demonstrou desempenhar um papel vital na ativação de mecanismos de defesa, e a produção de ROS. Esta descoberta tem implicações significativas no desenvolvimento de estratégias de combate ao fungo e no melhoramento genético da oliveira para aumentar sua resistência à antracnose.

Palavras-chave: Antracnose, *Olea europaea*, oliveira, resistência, suscetibilidade

Identification of genes potentially involved in the olive tree's response to infection by *Colletotrichum* spp.

Infection by the *Colletotrichum* spp. fungus, which causes anthracnose in olive trees (*Olea europaea*) of the 'Galega vulgar' cultivar, represents a threat to olive production and the quality of olive oils. One of the main focuses of this work was to analyse the genes that code for reactive oxygen species (ROS) in the olive tree during interaction with the fungus. The research revealed that several genes are potentially related to the response to oxidative stress and are actively involved in the olive tree's defence against infection by this fungus. Among these genes, *Endochitinase EP3-like (CH11)* has been shown to play a vital role in the activation of defence mechanisms and the production of ROS. This discovery has significant implications for the development of strategies to combat the fungus and for the genetic improvement of olive trees to increase their resistance to anthracnose.

Keywords: Anthracnose, *Olea europaea*, olive tree, resistance, susceptibility

Índice

Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	ix
2 Introdução	2
3 Revisão Bibliográfica	5
3.1 O Olival no Mundo e em Portugal	5
3.2 A Cultura da Oliveira	6
3.3 O fungo <i>Colletotrichum</i> spp.	8
3.3.1 Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> spp.	9
3.3.2 Meios de proteção contra a antracnose no olival.....	10
3.4 Interação da planta com os agentes patogénicos	11
3.5 Espécies reativas de oxigénio (ROS)	13
4 Materiais e Métodos	17
4.1 Material vegetal	17
4.2 Crescimento do isolado de fungo <i>Colletotrichum nymphaeae</i> para inoculação das plantas de oliveira	18
4.3 Inoculação das plantas de oliveira com <i>C. nymphaeae</i>	18
4.4 Recolha das amostras	20
4.5 Avaliação da infeção de <i>C. nymphaeae</i> nas plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’	21
4.5.2 Condições de PCR quantitativo (qPCR) para deteção de <i>C. nymphaeae</i>	22
4.6 Estudos da expressão génica nas plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’	22
4.6.1 Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)	22
4.6.2 Desenho de <i>primers</i> e avaliação de especificidade e eficiência	23
4.6.3 A avaliação da estabilidade da expressão dos genes	25
5 Resultados e Discussão	17
5.1 Avaliação do nível de infeção por <i>C. nymphaeae</i> em plantas de oliveira ‘Galega vulgar’	27
5.2 Resultados das análises de expressão genética por qPCR	29
5.2.1 Avaliação da especificidade dos <i>primers</i>	29
5.2.2 Avaliação da linearidade e eficiência de amplificação dos <i>primers</i>	31
5.2.3 Análise da expressão génica.....	32
6 Conclusão	35
7 Referências Bibliográficas	35
8 Apêndices	44

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa da Bacia do Mediterrâneo onde está representada a forma como a oliveira se tem difundido	5
Figura 2. Ciclo de vida do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. com a fase sexuada e fase assexuada.	10
Figura 3. Esquema ilustrativa da interação e resposta entre agente patogénico e planta hospedeira. HR: resposta hipersensível.....	12
Figura 4. Plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’ utilizadas no ensaio. A: Em estufa; B: No local do ensaio com condições de luz e temperatura controladas	17
Figura 5. Cultura do fungo <i>C. nymphaeae</i> em placa de Petri de 6 mm com meio de cultura PDA	18
Figura 6. A: Colheita dos esporos do fungo de <i>C. nymphaeae</i> através de raspagem das placas de Petri onde o fungo foi previamente colocado em meio de crescimento PDA; B: Filtragem do inóculo em gaze esterilizada de onde resultam apenas os conídios.	19
Figura 7. Estruturas do fungo do <i>C. nymphaeae</i> (conídios) coradas com a solução de azul lactofenol observadas ao microscópio ótico com ampliação de 400x.....	19
Figura 8. Processo de inoculação das plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’ com o fungo do <i>C. nymphaeae</i> ; A- Inoculação das plantas com pulverizador; B- Plantas cobertas com saco de plástico para manutenção da humidade.....	20
Figura 9. Processo de maceração das amostras das folhas das plantas de oliveira da cultivar ‘Galega vulgar’; A: Maceração em azoto líquido com pilão e com almofariz; B: Amostra em microtubo de 1,5 mL.....	21
Figura 10. Resultado do qPCR do gDNA do fungo <i>C. nymphaeae</i> e das amostras de oliveira ‘Galega vulgar’, demonstrando que o fungo está presente nas plantas. ‘+’: controlo positivo	27
Figura 11. Especificidade dos <i>primers</i> avaliada pela análise dos picos de <i>melting</i>	31
Figura 12. Expressão relativa dos genes com e sem a presença do fungo <i>C. nymphaeae</i> ao longo do ensaio onde T0 é antes da inoculação com o fungo <i>C. nymphaeae</i> , T1 é após 10 dias da inoculação das plantas e T2 é ao fim de 35 dias depois da exposição ao fungo.....	35

Índice de Tabelas

Tabela 1. Identificação dos genes de referência com a sua sequenciação e tamanho dos amplicões. pb: pares de bases	24
Tabela 2. Identificação dos genes alvo com a sua sequenciação e tamanho dos amplicões. pb: pares de bases.....	24
Tabela 3. Valores Ct obtidos por qPCR de cada planta de Oliveira ‘Galega vulgar’ recolhidas antes da inoculação (T0) e 35 dias após inoculação com o fungo <i>C. nymphaeae</i> (T2) e do fungo <i>C. nymphaeae</i> utilizado como controlo positivo. A verde estão indicadas as plantas selecionadas de expressão, nas quais o fungo não foi identificado em T0 e simultaneamente identificado em T2. Ct: <i>Cycle Threshold</i> ; N/D: não detetado.....	28
Tabela 4. Avaliação da linearidade e eficiência de amplificação dos <i>primers</i> utilizados nos estudos de expressão génica.....	32

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ACT- Actina

ANOVA- Análise de variância

APx- Ascorbato peroxidase

CHI1- Endochitinase EP3-like

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EF1a- Fator de alongação

ETI- Imunidade desencadeada pelo efetor

GAPDH- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPx- Glutathione peroxidase

gDNA- DNA genómico

H₂O₂- Peróxido de hidrogénio

HR - Resposta hipersensível

NaCl- Cloreto de sódio

MAP- Proteína-quinases ativadas por mitógenos

O₂- Oxigénio

OH●- Radicais hidroxilo

PAMPs- Padrões moleculares associados aos agentes patogénicos

PEROX2- Glutathione peroxidase 2

PEROX5- Glutathione peroxidase 5

PEROX8- Glutathione peroxidase 8

PTI- Imunidade ativada por PAMPs

qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA- Ácido ribonucleico

RNase- Ribonuclease

ROS- Espécies reativas ao oxigénio

SOD- Superóxido dismutase

THETA- Glutathione S-transferase THETA 1

TransFL3 - Glutathione S-transferase L3-like

TransDHAR- Glutathione S-transferase DHAR2-like

1 Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das culturas economicamente mais importantes dos países mediterrânicos alcançando em Portugal, sobretudo na região do Alentejo, uma posição de destaque no setor agrícola. Há séculos que é cultivada com o propósito da produção de azeite através dos seus frutos ou para conserva e posterior consumo em verde. A sua conserva permite um armazenamento de longa duração fazendo com que o seu consumo não seja mediado pela sazonalidade da produção de frutos. O azeite produzido é rico em compostos fenólicos com grandes benefícios para a saúde humana contribuindo para a prevenção de doenças cancerígenas e cardiovasculares. Os compostos fenólicos conferem ao azeite sabor e corpo, tornando-o único e essencial na dieta mediterrânea (De Oliveira *et al*, 2008).

Os fungos fitopatogénicos são responsáveis por doenças causadoras de prejuízos economicamente relevantes na maioria das áreas olivícolas. De entre essas doenças, destacamos a antracnose causada por fungos do género *Colletotrichum*. Os sintomas da doença geralmente ocorrem em frutos maduros, nas condições de humidade elevada do outono, e caracterizam-se por lesões escuras, com produção abundante de massas alaranjadas de esporos (conídios), que causam a queda de frutos e potencia a sua rápida degradação originando uma perda de qualidade dos frutos que chegam ao lagar, contribuindo para uma rápida oxidação dos azeites provenientes destes frutos contaminados. Para além dos frutos também a árvore pode ser afetada, apresentando desfoliação e conseqüente seca de ramos e raminhos, comprometendo a produção dos anos seguintes e o desempenho fisiológico da planta. Existe, no entanto, uma variabilidade fenotípica natural de resistência/suscetibilidade a estes fungos entre as diferentes cultivares de oliveira, sendo a ‘Galega vulgar’ conhecida como extremamente suscetível (Oliveira *et al*, 2003).

Compreender a resposta da oliveira à infeção por *Colletotrichum* spp. é de extrema importância para desenvolver estratégias eficazes de controle da doença. A resposta da planta a agentes patogénicos envolve uma interação complexa entre os genes da planta e a sinalização de defesa, que são ativados como parte de uma rede de assinatura complexa. Nesse contexto, a identificação dos genes envolvidos na resposta da oliveira à infeção por *Colletotrichum* spp. emerge como uma abordagem promissora para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a essa interação planta-patogéneo.

Nos últimos anos, os avanços foram alcançados na área de genómica vegetal, permitindo a identificação de genes específicos envolvidos na resposta das plantas a

agentes patogénicos. No entanto, apesar do crescente interesse em estudar a resposta da oliveira à infeção por *Colletotrichum* spp., ainda há muito espaço para se aprofundar o conhecimento sobre os genes específicos envolvidos nessa interação.

Esta dissertação de mestrado visa investigar a resposta da planta oliveira, mais concretamente da cultivar ‘Galega vulgar’, à infeção por *Colletotrichum* spp. por meio da identificação de genes potencialmente envolvidos nesse processo. Espera-se que os resultados obtidos forneçam contribuições significativas para o avanço do conhecimento científico na área. Além disso, essa identificação pode ter princípios importantes para a sustentabilidade da produção agrícola e a preservação de uma cultura agrícola tradicionalmente valiosa. O estudo dos genes e controlo molecular relacionados também podem abrir novas perspetivas para a engenharia genética de plantas, com potenciais aplicações na resistência a doenças não apenas na oliveira.

2.1 O Olival no Mundo e em Portugal

A oliveira, nativa da região do Mediterrâneo, Ásia tropical e Central e de várias partes de África, pertence à família botânica *Oleaceae* e género *Olea* e inclui aproximadamente 30 espécies, sendo uma das mais antigas culturas da bacia do Mediterrâneo (Langgut *et al*, 2019). É cultivada maioritariamente para a produção de frutos com a finalidade de ser transformada em azeite, mas também para consumo como azeitona de mesa. A olivicultura tem contribuído para diversos fins como económicos, sociais e culturais, gerando empregos e estando muito presente na gastronomia local (Costa, 1937). Embora a região do Mediterrâneo continue a ser a principal área de cultivo, esta cultura estende-se ao sul da África, América do Sul e do Norte, Austrália, Japão e China (IOC, 2022). No mapa da figura 2.1 observa-se a difusão da cultura da oliveira pela bacia do Mediterrâneo.

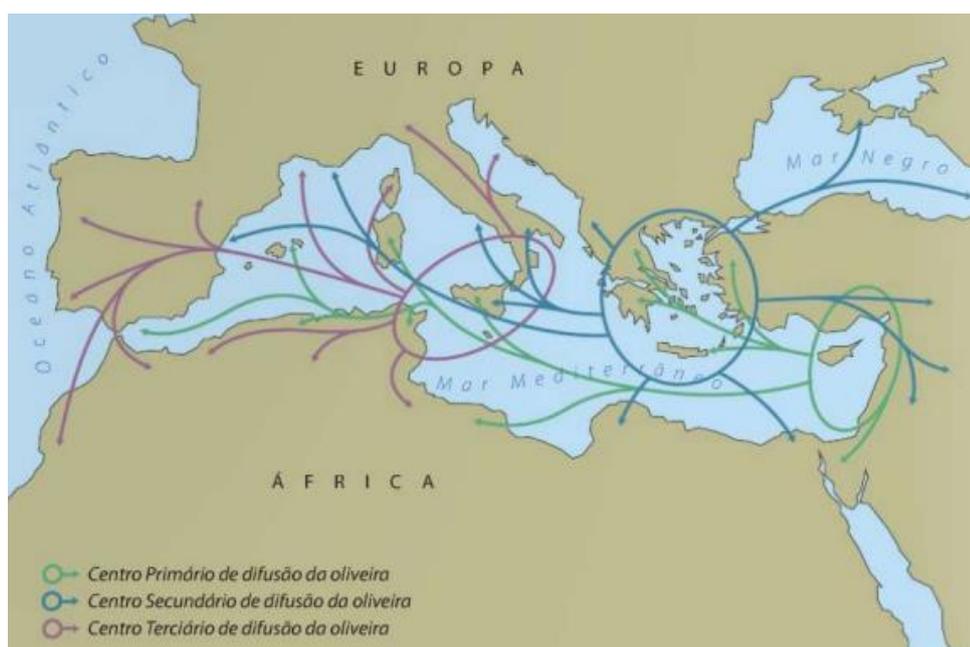


Figura 1. Mapa da Bacia do Mediterrâneo onde está representada a forma como a oliveira se tem difundido. Fonte: adaptado de Bohm *et al.*, 2013

De acordo com a FAOSTAT em 2019, os países que mais produzem azeitonas no mundo é a Espanha, a Grécia e a Itália, por ordem decrescente, respetivamente. Portugal em 2019, encontra-se em sétimo lugar com um total de 939.070 toneladas métricas de azeitonas colhidas nesse ano.

Em Portugal o setor da olivicultura deu continuidade à expansão e modernização da cultura. A cultura do olival é a que ocupa maior área cultivada sendo a que possui

maior número de explorações agrícolas. Comparando os recenseamentos efetuados em 2009 e 2019, verificou-se que a área de olival aumentou 12,3 % com um total de 41 mil hectares, enquanto o número de explorações com olival decresceu 0,6 %. A sua produção estende-se por 377 mil hectares, sendo que 98.9 % é destinado à produção de azeitona para azeite. O Alentejo é a principal região produtora, com 52,4 % em 2019 mais 3,5 % do que em 2009 da área de olivais, seguido de Trás-os-Montes com 21,7 %, com menos 0,7 % do que em 2009 e Beira Interior com 13,1 % com menos 1 % do que em 2009 com as restantes regiões com um total de 12,8 %. A cultura é praticada na sua maioria em regime intensivo e superintensivo, com densidades médias superiores a 300 árvores por hectare, sendo mais do que 1/5 da superfície de olival destinado à produção de azeite. A maioria das áreas exploradas em regime superintensivo com 13.8 % da área em 2019, apresenta densidades superiores a 1.500 árvores/hectare, sendo que 95.8 % encontram-se localizados no Alentejo (INE, 2021).

2.2 A Cultura da Oliveira

A cultura da oliveira é altamente adaptável a uma variedade de tipos de solo, incluindo solos francos, franco-limosos, franco-argilosos ou franco-argilo-limosos, desde que apresentem boa estrutura, boa drenagem e sejam ricos em calcário (DRAP Centro, 2018).

As plantas de oliveira demonstram uma preferência por um pH do solo situado entre 6,0 e 7,5, considerado ideal para o seu desenvolvimento saudável. No entanto, elas possuem uma notável capacidade de adaptação e de se desenvolverem em solos com valores de pH mais ácidos ou alcalinos. Produzem com precipitações anuais entre os 800 mm e os 1000 mm. Com temperaturas no período de repouso compreendidas entre -5 °C e 9 °C, no período de floração o olival requer temperaturas mais amenas entre os 12 °C e os 25 °C (DRABL, 2005).

A irrigação da cultura é crucial para a produção de azeitonas de forma que atinjam os calibres desejados. Tem uma grande influência na diferença entre anos de safra e contrassafra permitindo um aumento substancial de produção. A cultura da oliveira tem dois períodos críticos, nos quais a seca pode comprometer a produção: a fase de desenvolvimento do caroço e a fase de desenvolvimento da polpa. (DRAP Centro, 2018)

A espécie *Olea europaea* L., em termos de morfologia apresenta árvores que podem chegar aos nove metros com tronco grosso e retorcido, ainda que se possam ver velhas árvores com mais de 15 ou 20 m de altura com troncos de um e meio a dois metros de diâmetro. As folhas são persistentes de duração entre 1 e 3 anos, sendo as folhas simples, inteiras, sem estípulas e com um pecíolo curto a sua forma varia muito com a cultivar. A disposição das folhas em cada nó é oposto-cruzada. As inflorescências são compostas por dois tipos de flores hermafroditas e flores masculinas. As flores apresentam-se pequenas, actinomorfas, com simetria regular e compõem-se de duas sépalas, quatro pétalas, dois estames, um pistilo e um ovário súpero bicarpelar. O seu fruto é uma drupa com pericarpo rico em lípidos sendo a única espécie da família das Oleáceas com fruto comestível (Rodrigues & Correia, 2009).

Tradicionalmente as variedades mais cultivadas em Portugal eram a ‘Maçanilha’, ‘Carrasquenha’, a ‘Verdeal’, a ‘Cornezelo’, a ‘Cobrançosa’, a ‘Picual’, a ‘Arbequina’, a ‘Redondil’ e a ‘Galega *lato senso*’ (DRABL, 2005). Com o surgimento de novos métodos de condução da cultura começaram contudo a ser utilizadas variedades como a ‘Azeiteira’, a ‘Hojiblanca’ e a ‘Gordal’ (Sales *et al.*, 2020).

A variedade ‘Galega’ ou ‘Galega vulgar’ é cultivada em Portugal há séculos e constitui uma parte importante do património cultural do país e na produção de azeite (Lopes *et al.*, 2004). É uma variedade de grande rusticidade, um porte alternado e com produtividade mediana existindo alternância de produções de ano para ano. Com um fruto de baixo peso (< 2 g), um endocarpo de peso baixo a médio (< 0,30 g a 0,30 – 0,45 g) e uma relação polpa/caroço baixa (5,6 em média), destaca-se pela excelente qualidade do azeite e da resistência à seca. A ‘Galega’ tem um baixo rendimento em azeite (inferior a 18 %) é ainda caracterizado por uma baixa percentagem de ácido linoleico e uma elevada estabilidade (Sales *et al.*, 2020). É também muito suscetível a doenças e pragas como ao fungo *Colletotrichum* spp. causador de antracnose, à bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causadora da tuberculose da oliveira, a *Bactrocera oleae* (mosca da azeitona), a *Saissetia olea* (cochonilha) e a *Capnodium* sp. (fumagina). Por outro lado, é resistente a *Verticillium* causador da doença verticiliose, e sofre baixa incidência à doença olho-de-pavão causada pelo fungo *Venturia oleaginea* (Cordeiro *et al.*, 2010).

2.3 O fungo *Colletotrichum* spp.

Existem várias espécies de fungos pertencentes ao género *Colletotrichum* que são causadoras de doenças em plantas, geralmente referidas como antracnose, atacam uma vasta gama de hospedeiros. Estes agentes patogénicos têm uma distribuição mundial e uma enorme relevância global, pois são responsáveis por elevadas perdas económicas nos hospedeiros que infetam. Os hospedeiros mais comuns incluem muitas plantas dicotiledóneas, como o morango, a maçã, os citrinos, as drupas e cereais, como o milho e o sorgo (Talhinhas & Baroncelli, 2021).

Quanto ao modo de vida, as espécies do género *Colletotrichum* podem ser classificadas como necrotróficas, biotróficas, latentes, endofíticas e hemibiotróficas. As necrotróficas são aquelas que infetam e colonizam ativamente as células vegetais, levando à morte celular. As biotróficas são aquelas em que o fungo permanece no interior do tecido vegetal vivo e absorve ativamente os metabolitos da planta para o seu crescimento sem causar a morte às células da planta. As latentes ou quiescentes têm a capacidade de definir um período alargado no ciclo de vida em que o agente patogénico se encontra inativo no hospedeiro antes de posteriormente passar à fase ativa. E por fim as endofíticas que habitam nas plantas e que vivem dentro células da planta hospedeira como simbioses sem causar doença (De Silva *et al.*, 2017). Contudo as espécies de *Colletotrichum* spp. podem também ter uma fase biotrófica no início do seu ciclo de vida e de seguida mudar para uma fase necrotrófica, sendo por isso designadas por hemibiotróficas. Para estas espécies, as vesículas de infeção primária são formadas durante a infeção inicial das células epidérmicas sem as matar. Seguindo-se uma fase necrotrófica em que as hifas da infeção secundária invadem e matam as células adjacentes (Perfect *et al.*, 1999). O grau de hemibiotrófia pode variar entre diversas espécies de *Colletotrichum*, como *Colletotrichum nymphaeae*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum godetiae* (Materatski *et al.*, 2018). Esse grau está relacionado com o modo de alimentação dessas espécies e com o momento em que ocorre a transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica, sendo influenciado pelo estado do hospedeiro e pelas condições ambientais (De Silva *et al.*, 2017).

A espécie *Colletotrichum nymphaeae* é uma das espécies causadoras da antracnose da oliveira que é a doença mais destrutiva da produção de frutos e está amplamente distribuída em muitas regiões olivícolas do mundo, sendo responsável por quebras significativas no rendimento da cultura (Moral & Trapero, 2009). Em Portugal,

a doença atinge níveis epidêmicos, com elevada incidência e causando frequentemente perdas totais de rendimento, rivalizando, em termos de perdas, com a mosca da azeitona (*Bactrocera oleae*) como o problema fitossanitário mais importante na cultura da oliveira (Talhinhas *et al.*, 2015). As plantas podem ser afetadas superficialmente em todas as fases de desenvolvimento, desde as plântulas até às plantas adultas. Os sintomas da antracnose incluem lesões necróticas escuras, que são ovais ou angulares nos frutos verdes ou a entrar em maturação (Talhinhas & Baroncelli, 2021). Esta doença é caracterizada pela mumificação dos frutos, folhas murchas, ramos e rebentos mortos, os frutos atacados pelo fungo que são processados no lagar possuem maior acidez levando à depreciação do azeite, com conseqüente desvalorização do mesmo (Moral & Trapero, 2009).

2.3.1 Ciclo de vida de *Colletotrichum* spp.

Para se dar início ao ciclo de vida de *Colletotrichum* spp. são necessárias condições climáticas específicas e favoráveis tais com a humidade relativa igual ou superior a 98 % , e temperaturas com um ótimo entre os 17 °C e os 20 °C mas podendo ocorrer também com extremos entre os 5 °C e os 30 °C (Talhinhas *et al.*, 2018).

Colletotrichum spp. tem um ciclo de vida perfeito com uma fase sexuada e uma fase assexuada (figura 2.2), sendo a fase sexuada responsável pela variabilidade genética e a fase assexuada é responsável pelo aumento populacional do fungo. Este fungo passa o Inverno sobe a forma sexuada em peritécas localizadas em cancos e resíduos vegetais (Agrios, 2005). A infeção pela forma assexuada do fungo, dá-se na planta quando as condições de humidade e temperatura são adequadas, como referido acima. Inicia-se através de feridas causadas fisiologicamente ou por insetos, como a mosca da azeitona (*Bactrocera oleae*), ou através da epiderme que é degradada por enzimas produzidas pelo apressório do fungo (O'Connell *et al.*, 2012). A deposição dos esporos assexuados (conídios) nas superfícies das plantas marca o início do processo de germinação dessas estruturas. Os conídios germinam formando apressórios, que permitem a penetração das hifas nas células da epiderme e posteriormente no mesocarpo do fruto. Essa etapa inicial de crescimento e colonização dos tecidos vegetais é crucial para estabelecer a infeção. Posteriormente e após a colonização dos tecidos, ocorre a esporulação, o que resulta em um aumento significativo do grau de infeção e da área infetada (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

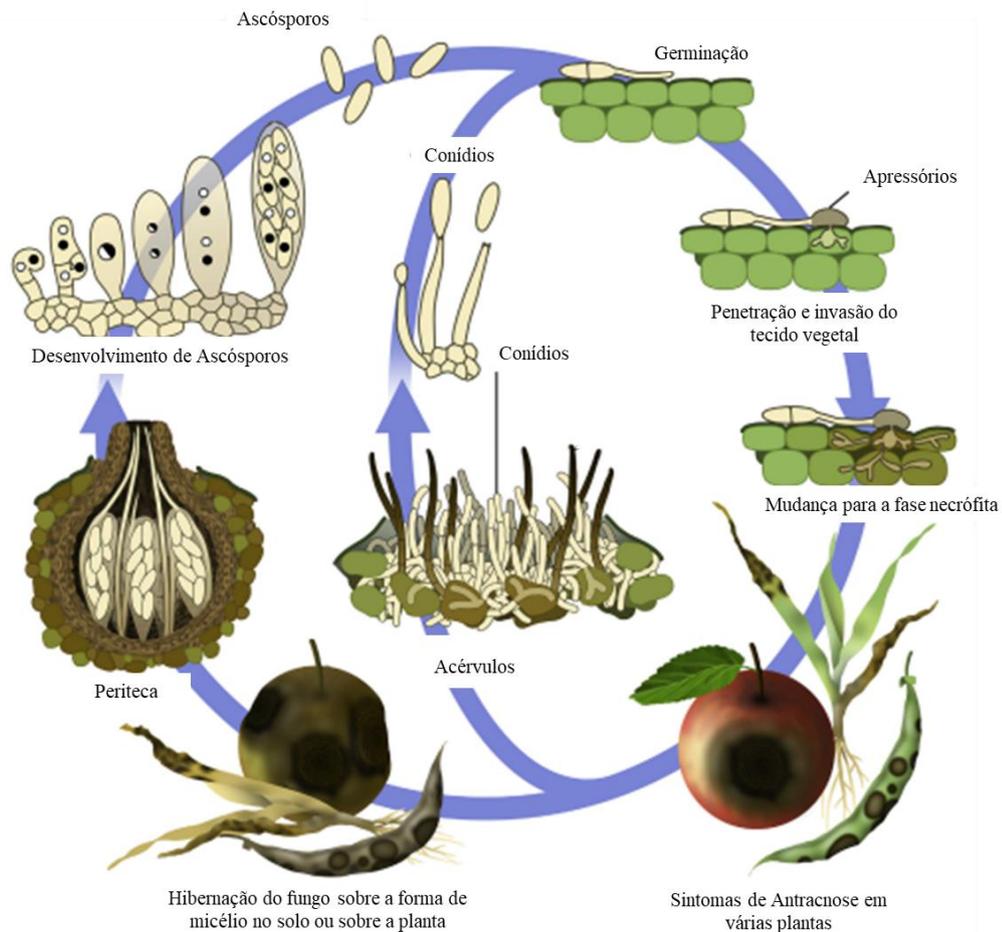


Figura 2. Ciclo de vida do fungo *Colletotrichum* spp. com a fase sexuada e fase assexuada
 Fonte: adaptado de De Silva *et al.*, 2017

2.3.2 Meios de proteção contra a antracnose no olival

Como meios de proteção para a doença da antracnose no olival, é recomendado um maior arejamento e iluminação da copa das árvores, sendo isso possível com podas que abram o interior da copa favorecendo a entrada de luz e a circulação de ar. A destruição das folhas, frutos com inóculo e restos de poda, caídos no chão reduz significativamente a quantidade de inóculo presente no olival. A proteção contra esta doença passa também pelo controlo da mosca da azeitona uma vez que os orifícios abertos por esta, aquando da postura dos ovos, constituem uma porta de entrada, para o fungo (López-Escudero *et al.*, 2008).

A utilização de variedades tolerantes ou resistentes como a ‘Cobrançosa’ que é moderadamente tolerante e a ‘Azeiteira’ que é considerada resistente, nos olivais é uma opção viável, reduzindo o impacto da doença na oliveira (Materatski *et al.*, 2018).

Os fungicidas cúpricos sobre forma de sulfato de cobre, hidróxido de cobre e oxiclureto de cobre com ação preventiva e a trifloxistrobina (fungicida sistémico) com ação preventiva e também curativa são os únicos pesticidas homologados para o combate à antracnose em Portugal e com venda homologada pela DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária (<https://sifito.dgav.pt/divulgacao/usos>). Também a suplementação com cálcio foliar depois do endurecimento do caroço, aumenta o endurecimento das paredes celulares da planta e torna-as mais difíceis de penetrar pelo fungo (White & Broadley, 2003).

2.4 Interação da planta com os agentes patogénicos

A interação das plantas com os agentes patogénicos é um processo complexo e dinâmico que envolve a ativação de vários mecanismos de defesa pela planta para resistir ou tolerar o agente patogénico invasor. Os genes das plantas desempenham um papel crítico nos mecanismos de defesa das plantas contra os agentes patogénicos. Estes genes codificam várias proteínas que funcionam na sinalização de defesa, no reconhecimento de agentes patogénicos e nas vias de resposta de defesa (Jones & Dangl, 2006).

As plantas têm desenvolvido vários mecanismos de defesa a ataques de agentes patogénicos. Estes mecanismos incluem barreiras físicas, tais como endurecimento das paredes celulares e possuem também defesas químicas, como a produção de compostos antimicrobianos (Miescher-Institut & Box, 2000). Além disso, desenvolveram um sistema imunitário intrincado que envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (PAMPs) e a ativação de respostas de defesa (Jones & Dangl, 2006).

Os agentes patogénicos têm, contudo, desenvolvido várias estratégias para contrariar as defesas das plantas e causar doenças. Isto inclui a secreção de proteínas efetoras que interferem com os mecanismos de defesa das plantas, a manipulação das funções das células hospedeiras, e a evasão das respostas de defesa das plantas (Zipfel & Oldroyd, 2017). As proteínas efetoras podem visar vários componentes do sistema imunitário das plantas, incluindo as proteínas recetoras, moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição (Win *et al.*, 2012).

O reconhecimento do agente patogénico é designado por imunidade ativada por PAMPs (PTI). As respostas intracelulares associadas à PTI incluem fluxos rápidos de iões

através da membrana plasmática, ativação da MAP quinase, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações rápidas na expressão de genes e reforço da parede celular. Os agentes patogênicos desenvolveram estratégias para infectar as plantas hospedeiras, quer evitando o reconhecimento quer suprimindo as etapas de sinalização subsequentes. Em muitos casos, a supressão da PTI envolve a secreção de efetores de virulência pelos agentes patogênicos. Numa coevolução dinâmica entre plantas e microrganismos causadores de doença, algumas plantas evoluíram para um sistema de resistência com proteínas R para reconhecerem estes efetores direta ou indiretamente. Esta chamada imunidade desencadeada pelo efector (ETI) é frequentemente acompanhada de morte celular local, conhecida como resposta hipersensível (HR). Por sua vez, os agentes patogênicos desenvolveram efetores capazes de suprimir a ETI, e assim se desenrola a ‘corrida ao armamento’ entre o hospedeiro e os agentes patogênicos (figura 2.3) (Zipfel, 2008).

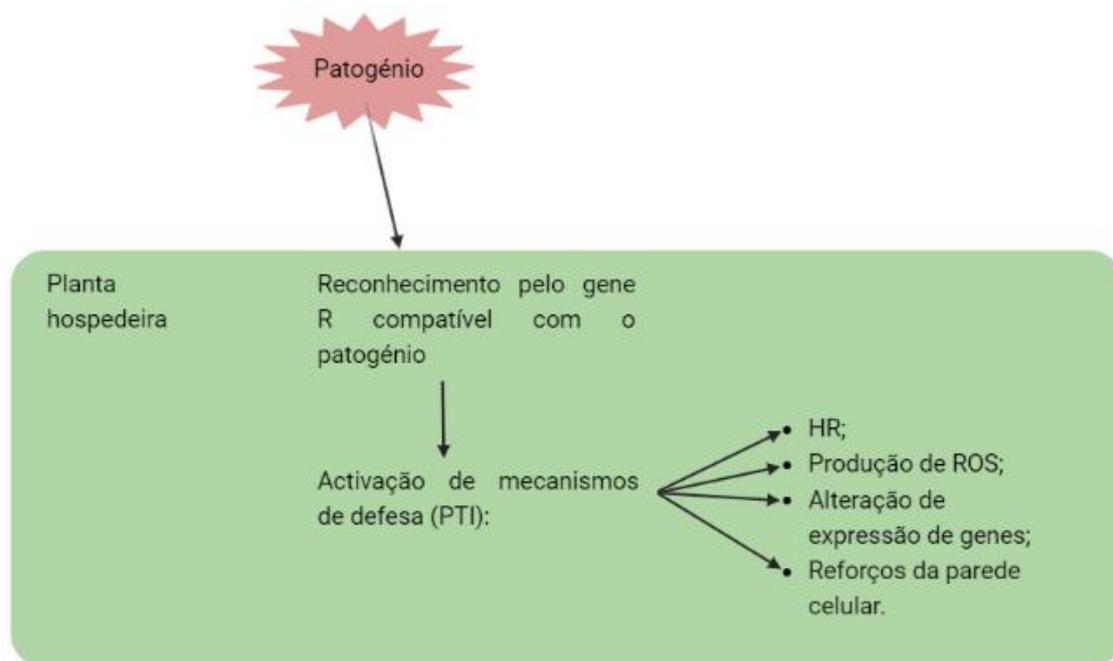


Figura 3. Esquema ilustrativa da interação e resposta entre agente patogênico e planta hospedeira. HR: resposta hipersensível

A interação entre genes de plantas e agentes patogênicos é influenciada por vários fatores ambientais, tais como temperatura, humidade e condições do solo. Por exemplo, a expressão dos genes de defesa das plantas pode ser induzida por certos estímulos ambientais, como stress por falta de água e temperaturas muito elevadas (Pieterse *et al.*, 2012). Além disso, alguns agentes patogênicos têm desenvolvido mecanismos para

manipular o ambiente vegetal de forma a favorecer o seu crescimento e reprodução (Jones & Dangl, 2006).

Os avanços na biologia molecular e genómica de plantas permitiram aos investigadores identificar e caracterizar genes envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas, levando ao desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a resistência destas aos agentes patogénicos (Boller & Felix, 2009). Por exemplo, já foram identificados genes que codificam as proteínas de resistência, que são recetores que reconhecem especificamente as proteínas efetoras e desencadeiam respostas de defesa (Cesari *et al.*, 2014). Ao introduzir estes genes de resistência em plantas suscetíveis, estes investigadores puderam aumentar a sua resistência ao ataque de agentes patogénicos.

Alguns genes da planta estão intrinsecamente ligados a respostas de defesa das plantas contra a infeção de agentes patogénicos. O processo de defesa de algumas plantas a patógenos específicos envolve uma rede intrínseca de sinais, cujos componentes são ainda alvo de estudos. Dentro dos mecanismos de defesa das plantas, os genes R de resistência são os mais estudados. O processo é iniciado, quando uma planta tem o gene resistência R e reconhece o agente patogénico correspondente a esse gene R, havendo assim compatibilidade entre eles, quando não há compatibilidade e a planta não possui o gene R compatível com o agente patogénico, não existe resistência e dá-se infeção da planta instalando-se a doença (Marconi *et al.*, 2011).

2.5 Espécies reativas de oxigénio (ROS)

As ROS são moléculas químicas intracelulares que contêm oxigénio (O_2) e são reativas em relação a lípidos, proteínas e DNA. Incluem o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), bem como os radicais hidroxilo ($OH\bullet$). As ROS são quimicamente mais reativas do que o O_2 e são capazes de desencadear vários eventos biológicos. Cada espécie reativa ao oxigénio tem propriedades químicas intrínsecas diferentes, que determinam a sua reatividade e os seus alvos biológicos preferenciais. O O_2 é produzido durante o metabolismo oxidativo através da redução de um eletrão do O_2 molecular. O $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente convertido pela *superóxido dismutase* (SOD) em H_2O_2 , que pode afetar a sinalização celular ao interagir com os tióis das proteínas. Ao contrário do $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 pode difundir-se facilmente através das membranas, tornando-o uma molécula de sinalização intracelular. Na presença de iões ferrosos ou cuprosos, o H_2O_2

pode transformar-se num radical hidroxilo, que é muito reativo e provoca a oxidação de lípidos, proteínas e DNA, resultando em danos para a célula (Glasauer & Chandel, 2013).

As ROS são conhecidas por desempenhar vários papéis na fisiologia vegetal. Servem como moléculas sinalizadoras que regulam vários processos celulares, como a divisão celular, crescimento e diferenciação (Fernández-Ocaña *et al.*, 2011). As ROS também desempenham um papel importante na resposta a stresses bióticos e abióticos, ativando mecanismos de defesa, como a produção de proteínas relacionadas com sistema imunológico da planta (del Río *et al.*, 2006).

Existem genes já identificados aos quais foram feitos estudos que comprovam a sua envolvimento em mecanismos de defesa nas plantas e com os ROS como é o caso do SOD, onde há evidências de que a sobre-expressão do SOD pode proteger as plantas contra condições adversas (Bowler *et al.*, 1994). Este gene que codifica uma enzima que catalisa a conversão de radicais superóxidos em peróxido de hidrogénio, uma espécie menos tóxica. A SOD é crucial para a eliminação de ROS e para a proteção das células contra danos oxidativos (Fernández-Ocaña *et al.*, 2011). As famílias de genes com envolvimento no processo de defesa e imunidade das plantas como é o caso da família da Glutathione é um dos principais antioxidantes endógenos das plantas, conhecido por desempenhar um papel importante nos mecanismos de defesa das plantas. A Glutathione funciona como um substrato nos mecanismos de defesa antioxidante, conjugando-se com compostos eletrofílicos tóxicos, eliminando radicais livres e reduzindo peróxidos. Ainda dentro da família da Glutathione que se divide em várias subfamílias existe a Glutathione peroxidase e a Glutathione S-transferase, que têm envolvimento no metabolismo antioxidante das plantas (Anderson & Davis, 2004).

A família das Quitinases que têm um papel nas plantas de defesa contra ataques de agentes patogénicos e pode ser dividida em duas subfamílias: as exoquitinases, que demonstram atividade apenas para a extremidade não redutora da cadeia da quitina; e as endoquitinases, têm o papel da hidrólise de polímeros (Kasprzewska, 2003).

Vários genes relacionados com o metabolismo do oxigénio foram identificados nas plantas, e o seu papel na regulação do stress oxidativo tem sido amplamente estudado. O ascorbato peroxidase (APx) é um gene importante envolvido na limpeza de ROS e na manutenção do equilíbrio celular redox. Este gene codifica uma enzima que catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio em água utilizando o Ascorbato como agente

reductor. A Glutathione peroxidase (GPx) é um gene que codifica uma enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogénio e outros peróxidos orgânicos utilizando a Glutathione como agente reductor. A GPx desempenha um papel crucial na desintoxicação de ROS e na proteção das células contra danos oxidativos (Chaki *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstraram a importância das ROS na fisiologia vegetal e na resposta ao stress. Por exemplo, foi descoberto que a interação entre girassol e o míldio *Plasmopara halstedii* foi regulada pela sinalização ROS, com as ROS atuando como uma componente chave da resposta de defesa da planta (Chaki *et al.*, 2009). Foi também mostrado que a exposição prolongada a stress de NaCl resultou na resposta diferencial de enzimas antioxidantes de cloroplastos e mitocôndrias em plantas de ervilha, indicando a importância dos sistemas de desintoxicação de ROS na resposta da planta ao stress abiótico (Gómez *et al.*, 1999). As ROS também desempenham papéis essenciais no desenvolvimento das folhas, senescência e dormência de órgãos. Por exemplo, a expressão de Catalase2 é reduzida nas folhas de *Arabidopsis thaliana* após o início da floração. Isso resulta na acumulação de H₂O₂ promovendo a expressão de um gene, necessário para a senescência da folha (Huang *et al.*, 2019).

3 Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado no ensaio foi composto por dez plantas de oliveira da cultivar ‘Galega vulgar’. Estas plantas foram obtidas por cultura *in vitro* no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora, tendo sido posteriormente transplantadas para tabuleiros e mantidas numa estufa localizada na Herdade da Mitra (Universidade de Évora), onde permaneceram durante um período de 90 dias (figura 3.4A). A estufa possui um sistema de arrefecimento por movimento forçado do ar em conjugação com uma parede de arrefecimento evaporativo, e a sua temperatura média era de 26 °C. Após este tempo, as plantas foram transplantadas para vasos de 1,5 litros com substrato comercial (Plantobalt, Estonia) e mantidas em condições de iluminação e temperatura controladas (figura 3.4B). O fotoperíodo nesta fase teve duração de 12 h dia/noite e a temperatura média da sala foi de 22 °C.



Figura 4. Plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’ utilizadas no ensaio. A: Em estufa; B: No local do ensaio com condições de luz e temperatura controladas

3.2 Crescimento do isolado de fungo *Colletotrichum nymphaeae* para inoculação das plantas de oliveira

Um isolado do fungo *C. nymphaeae* pertencente à coleção do Laboratório de Micologia da Universidade de Évora foi selecionado para posterior inoculação das plantas. Porções do isolado que estava armazenado a 4 °C em meio de cultura ágar dextrose de batata (PDA) foram repicados para 6 placas de Petri de 6 mm de diâmetro com o referido meio de cultura e mantidos durante 28 dias a 24 °C (figura 3.5). Desta forma pretendeu-se promover o crescimento de fungo *C. nymphaeae* para posterior inoculação das plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’.

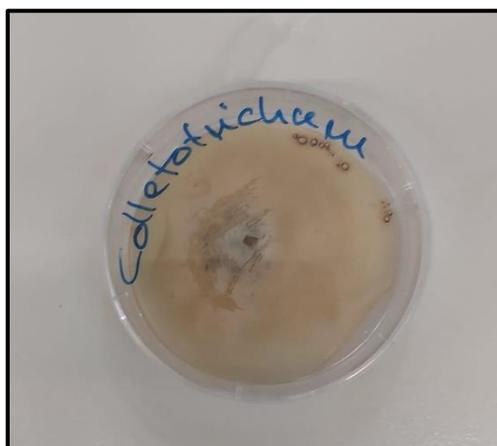


Figura 5. Cultura do fungo *C. nymphaeae* em placa de Petri de 6 mm com meio de cultura PDA

3.3 Inoculação das plantas de oliveira com *C. nymphaeae*

Para a realização da inoculação das plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’ com o fungo *C. nymphaeae* fez-se a preparação do inóculo, que começou com a raspagem das seis placas de Petri com o isolado do fungo com o auxílio de água estéril e de uma espátula devidamente desinfetada (figura 3.6A). Este procedimento foi realizado sempre próximo de um bico de bunsen de forma a manter condições de assepsia. A massa de esporos e micélio do fungo resultante deste procedimento foi filtrado por gaze esterilizada de forma a obter apenas os esporos (conídios) (figura 3.6B). Para avaliar a quantidade e qualidade dos esporos, o produto foi corado com azul de lactofenol em lamina de microscópio e, com auxílio do microscópio ótico (Olympus 2X41, Tóquio, Japão) com ampliação de 400 x, (figura 3.7) realizou-se a respetiva contagem, com o auxílio de uma câmara de Marienfeld, que permite a determinação da concentração de conídios por mililitro de água ultrapura. Foi ajustada a concentração para 1×10^{-6} . Uma amostra de fungo foi ainda

macerada em azoto líquido com o auxílio de um pilão e de um almofariz, e conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração de DNA genómico (gDNA).

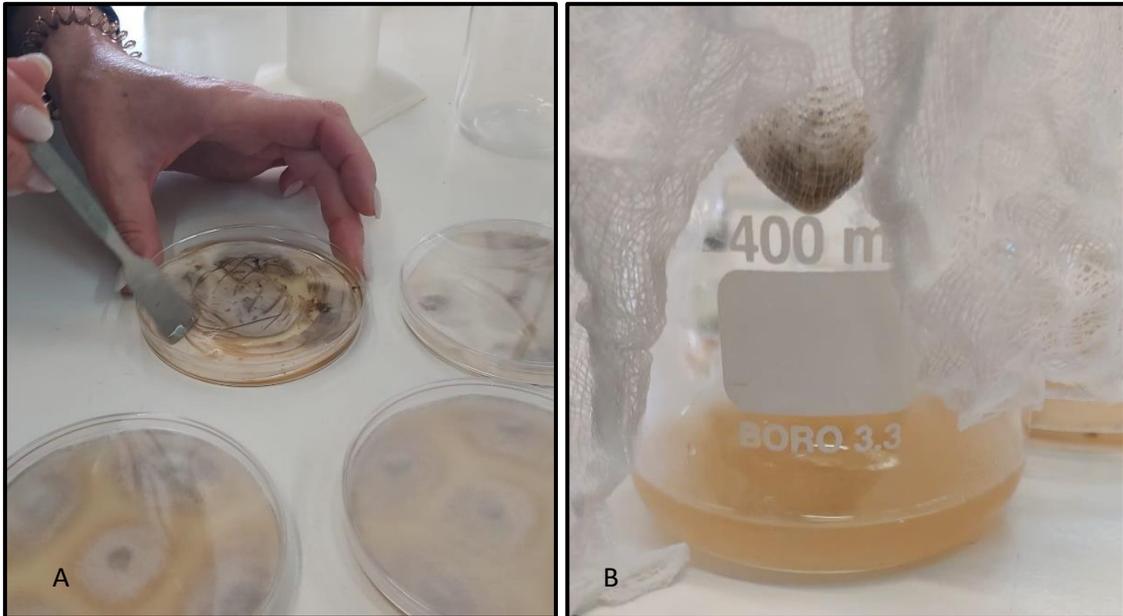


Figura 6. A: Colheita dos esporos do fungo de *C. nymphaeae* através de raspagem das placas de Petri onde o fungo foi previamente colocado em meio de crescimento PDA; B: Filtragem do inóculo em gaze esterilizada de onde resultam apenas os conídios



Figura 7. Estruturas do fungo do *C. nymphaeae* (conídios) coradas com a solução de azul lactofenol observadas ao microscópio ótico com ampliação de 400x.

As dez plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’ foram inoculadas por pulverização com a suspensão de *C. nymphaeae* (Figura 3.8A). Após a inoculação, as plantas foram cobertas com um saco de plástico de modo a conservar a humidade nas folhas, favorecendo o crescimento do fungo (Figura 3.8B). Os sacos de plástico foram retirados 48 horas após a inoculação.



Figura 8. Processo de inoculação das plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’ com *C. nymphaeae*; A- Inoculação das plantas com pulverizador; B- Plantas cobertas com saco de plástico para manutenção da humidade

3.4 Recolha das amostras

Para a recolha de amostras foram seleccionadas as dez plantas do ensaio, das quais foram recolhidas cinco a seis folhas por planta em cada tempo de amostragem.

As recolhas das amostras foram efetuadas em três tempos diferentes: a primeira amostragem (T0) foi efetuada antes da inoculação das plantas com fungo do *C. nymphaeae*, a segunda amostragem foi efetuada 10 dias depois da inoculação das plantas (T1) e a terceira amostragem foi efetuada 35 dias depois da inoculação (T2).

Após a recolha, as amostras foram maceradas em azoto líquido com o auxílio de um pilão e de um almofariz (Figura 3.9A), conservadas em microtubos de 1,5 ml (Figura 3.9B) e mantidas a -80°C até posterior utilização.

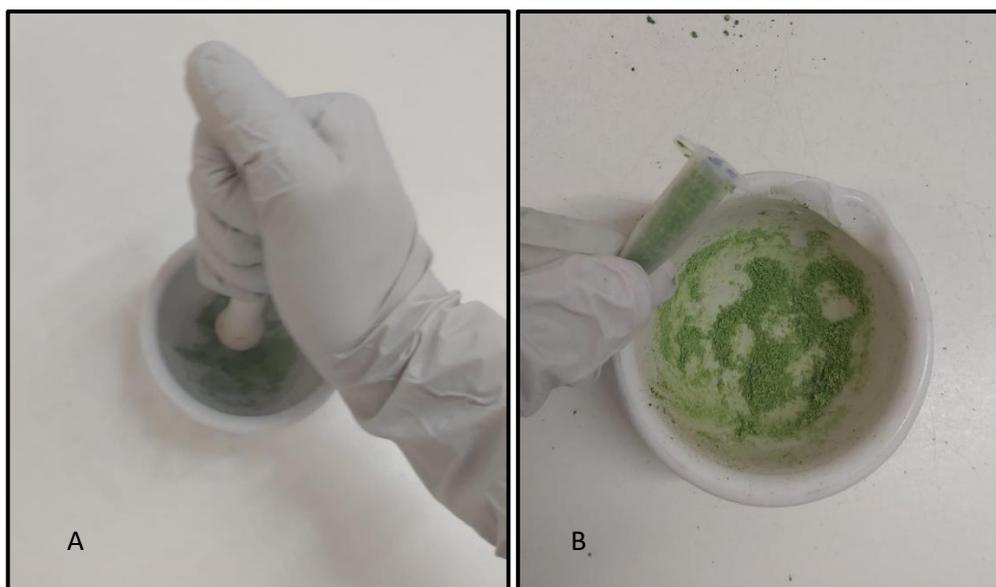


Figura 9. Processo de maceração das amostras das folhas das plantas de oliveira da cultivar ‘Galega vulgar’. A: Maceração em azoto líquido com pilão e com almofariz; B: Amostra em microtubo de 1,5 mL

3.5 Avaliação da infecção de *C. nymphaeae* nas plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’

3.5.1 Extração do gDNA do material vegetal e do fungo

A extração do gDNA foi realizada utilizando o ‘DNeasy Plant mini kit’ (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo protocolo do fabricante, tendo sido utilizados 100 mg de material vegetal e 100 mg de estruturas do fungo *C. nymphaeae*. Foram utilizadas as dez plantas do ensaio nos tempos de amostragem T0 e T2, e a amostra do fungo, referida em 3.3. No final do procedimento, cada amostra foi eluída em 50 μ L de solução de eluição, fornecida pelo kit utilizado.

A quantificação do gDNA e a avaliação da sua pureza foram determinadas no equipamento Quawell Q9000 microspectotómetro (Quawell Technology, Beijing, China).

3.5.2 Condições de PCR quantitativo (qPCR) para detecção de *C. nymphaeae*.

A detecção e quantificação de *C. nymphaeae* foi realizada por qPCR nas dez plantas nos tempos T0 e T2, com os *primers* que já tinham sido usados em estudos anteriores para a detecção deste fungo na oliveira (Azevedo-Nogueira *et al.*, 2021) (Lime_1F : 5'-GCCAACAATAAACGCCACT-3', Lime_2R: 5'-GACTTATTCGGTGACGTGCC-3').

Na mistura de reação de qPCR foram utilizados 100 ng de gDNA por amostra, 9 µL de NZY qPCR Master Mix Green (Nzytech, Lisboa, Portugal), 400 nM de *Primer Forward e Primer Reverse* e 3 µL de água ultrapura, perfazendo um volume total de 18 µL. O equipamento de qPCR utilizado foi um sistema LineGene9600Plus (BIOER, Hangzhou, China), tendo sido sempre realizadas três replicas técnicas de cada amostra. Em cada placa de qPCR foi incluído controlo negativo e também gDNA do isolado do *C. nymphaeae* como controlo positivo.

Os valores de *Cycle Threshold* (Ct) foram adquiridos por qPCR, para cada amostra, com as seguintes condições: 20 s a 95 °C para uma desnaturação inicial, seguida de um programa de amplificação de 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95 °C e 20 s a 60 °C. Adicionalmente foi acrescentada uma curva de dissociação (curva de *melting*), uma etapa final ao programa para testar a especificidade do qPCR, apresentando um ciclo único em 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min e *rump-up* 0,2 °C/s a 95 °C durante 15 min. Para avaliação da especificidade do teste qPCR das reações foi feita a análise da curva de *melting*.

3.6 Estudos da expressão génica nas plantas de oliveira cultivar ‘Galega vulgar’

3.6.1 Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA foi efetuada em cinco das dez plantas do ensaio, nas quais não foi detetada a presença do fungo *C. nymphaeae* antes da inoculação (T0) e simultaneamente, detetada a presença do fungo 35 dias após a inoculação (T2) (ver procedimento no ponto 3.5). Foi utilizado o kit ‘RNeasy Plant mini kit’ (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do kit, utilizando 100 mg de material vegetal de cada uma das cinco plantas recolhidos nos três tempos de recolha T0, T1 e T2 perfazendo um total de 15 amostras. No final, foi utilizada 50 µL de água isenta da enzima RNase para eluição do RNA total das células vegetais. O RNA foi conservado a -80 °C.

A quantificação do RNA e a avaliação da sua pureza foram determinadas em Quawell Q9000 micropectotómetro (Quawell Technology, Beijing, China). A síntese do cDNA foi realizada após descongelar em gelo e homogeneizar as amostras de RNA recolhido anteriormente. Foi utilizado o kit da “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando-se 1000ng de RNA. Em seguida efetuou-se uma diluição em solução aquosa do cDNA de cada amostra numa concentração de 1:10, sendo esta diluição a solução de trabalho para prosseguir os estudos de expressão génica por qPCR.

3.6.2 Desenho de *primers* e avaliação de especificidade e eficiência

Para os estudos de expressão génica, foram selecionados os genes de referência de acordo com estudos realizados previamente: *Actina (ACT)*, *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* e *Fator de alongação (EF1a)* (ver na Tabela 1). Os genes alvo foram selecionados com base em informações anteriores relativas ao seu envolvimento no sistema imunitário das plantas ao ataque de agentes patogénicos, sendo estes os seguintes: *SOD*; *Endochitinase EP3-like (CHI1)*; *Glutathione S-transferase L3-like (TransFL3)*; *Glutathione peroxidase 2 (PEROX2)*; *Glutathione S-transferase THETA 1 (THETA)*; *Glutathione S-transferase DHAR2-like (TransfDHAR)*; *Glutathione peroxidase 5 (PEROX5)*; e *Glutathione peroxidase 8 (PEROX8)* (ver na Tabela 2). As sequências dos genes foram retiradas da base de dados ensemblplant (<https://plants.ensembl.org/index.html>). Os *primers* utilizados foram desenhados no software Primer 3.0 (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). As sequências dos *primers* e respetivo tamanho de amplificação está indicado nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 1. Identificação dos genes de referência com a sua sequenciação e tamanho dos amplicões. pb: pares de bases

Genes	Identificação dos genes	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho dos amplicões (pb)	Referência
<i>ACT</i>	OE9A095224	Fw: TTGCTCTCGACTATGAACAGG Rv: CTCTCGGCCCAATAGTAATA	106	Velada <i>et al.</i> 2018
<i>GAPDH</i>	OE9A027234	Fw: ACAGCTCCTGGTAAGGGTGA Rv: GGCTTGCGTCAAGAAGTCT	210	Ray & Johnson 2014
<i>EF1a</i>	OE9A002593	Fw: TTTGAGGGTGACAACATGAT Rv: CAGGGTTGGGCCCTTGATAC	64	Velada <i>et al.</i> 2018

Tabela 2. Identificação dos genes alvo com a sua sequenciação e tamanho dos amplicões. pb: pares de bases

Genes	Identificação dos genes	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho dos amplicões (bp)
<i>SOD</i>	OE9A101614T2	Fw: AGAAGGAGATGCTCCGACAA Rv: GGTGCCATCTTCACCAACTT	214
<i>CHI1</i>	OE9A109397T1	Fw: TGTTGCCTACTCTCATTTTTGC Rv: CCGGCCCATAGTTGAAGTT	155
<i>TransFL3</i>	OE9A006478T1	Fw: TGCCAAACAGAACTTTGCAG Rv: ATGGCCCATCATCGAATTTA	152
<i>PEROX2</i>	OE9A032703T1	Fw: TGCAGCCCCTCTCTACAAGT Rv: GCCCAAAGCATCTTGAATGT	172
<i>THETA</i>	OE9A088562T3	Fw: AATGGACGTTTTCTGCTTGG Rv: GAGGTCTCGTCGCATTCTTC	169
<i>TransfDHAR</i>	OE9A054227T1	Fw: GTCCATTCTGCCAAAGGGTA Rv: ACTTCAGGAGGAGCAGACGA	226
<i>PEROX5</i>	OE9A093520T2	Fw: TGC GGATACACGAATTTGAA Rv: TAGACTGGAGCGGCATCTTT	218
<i>PEROX8</i>	OE9A035552T1	Fw: GCAGAGAAAGACCCAGCATC Rv: TCTCCAGCCCTTGATCTTG	190

Para o cálculo da especificidade dos *primers* foi necessário avaliar o padrão da curva de *melting* gerado após amplificação. As condições de qPCR utilizadas foram idênticas às descritas em 3.5.2.

Para a determinação da eficiência de cada par de *primers* foi utilizado o cDNA obtido anteriormente (3.5.2), e preparada uma mistura composta pelas 15 amostras

selecionadas do ensaio. De seguida, realizou-se a preparação de cinco de diluições em série da concentração de cDNA (1:10, 1:40, 1:160, 1:640 e 1:2560). As reações de qPCR foram realizadas em triplicado, tendo sido também incluídos controlos negativos em cada placa. Foram determinados os valores do declive e da linearidade (R^2) para cada par de *primers*. O valor da eficiência (E) foi calculado para cada par de *primers* através da fórmula: $E(\%) = (10 - (\frac{1}{\text{declive}}) - 1) \times 100$ (Rasmussen, 2001).

3.6.3 A avaliação da estabilidade da expressão dos genes

A avaliação da estabilidade da expressão dos genes de referência e a seleção da combinação mais apropriada de genes a ser utilizada para a normalização dos dados, foi feita utilizando a aplicação de estatística *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002). O parâmetro de estabilidade que permite selecionar os genes de referência é o parâmetro M que deverá ter um valor inferior a 1.5. Para estudar a expressão do gene alvo, os valores de Ct foram regredidos no logaritmo da curva cDNA previamente construída. Subsequentemente, o valor das unidades arbitrárias normalizadas dos genes alvo, para cada amostra, foi calculado utilizando fatores de normalização obtidos para os genes de referência.

3.6.4 Tratamento estatístico

Foi feita uma transformação logarítmica de base “e” dos dados de expressão dos genes obtidos anteriormente, usando o teste de análise de variâncias (ANOVA) no software IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows, version 21.0, Armonk, NY IBM Corp) com um nível de significância definido como $p < 0,05$. As comparações múltiplas foram feitas através do teste de Bonferroni (Jafari & Azuaje, 2006).

4 Resultados e Discussão

4.1 Avaliação do nível de infecção por *C. nymphaeae* em plantas de oliveira ‘Galega vulgar’

Para se avaliar o nível de infecção por *C. nymphaeae* em plantas de oliveira ‘Galega vulgar’ foi diagnosticada a presença do fungo antes da inoculação do fungo (T0) e com 35 dias após a inoculação (T2). Para tal foram comparados os valores de Ct médios de cada planta obtidos por qPCR antes da inoculação e após a inoculação. Foi verificada uma amplificação do fungo nas amostras sendo comprovada desta forma que o fungo infetara as plantas (figura 4.10). Foi realizada a quantificação do gDNA de cada amostra bem como a avaliação da sua qualidade (apêndice A).

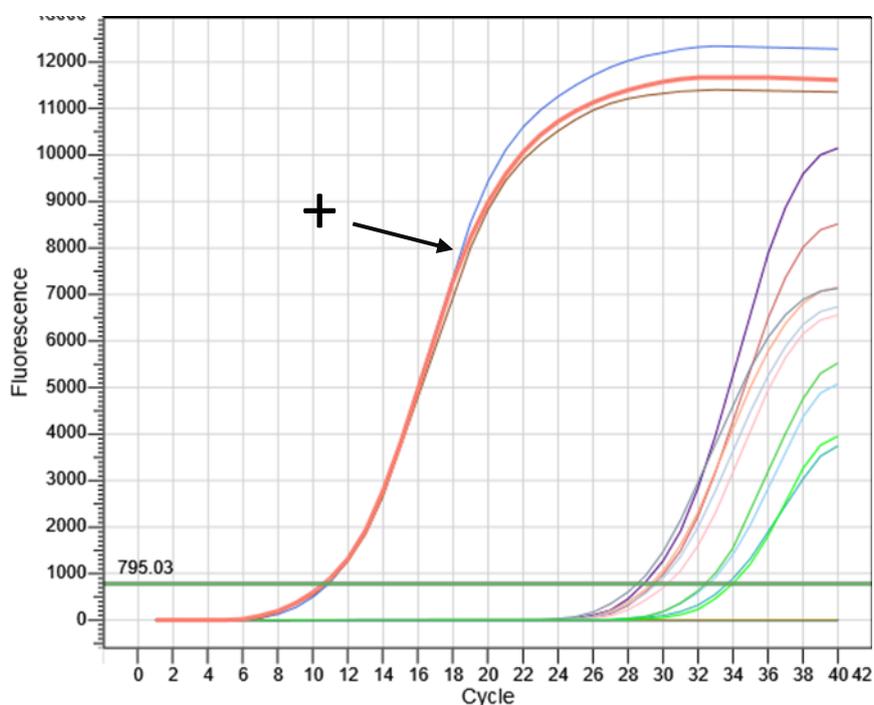


Figura 10. Resultado do qPCR do gDNA do fungo *C. nymphaeae* e das amostras de oliveira ‘Galega vulgar’, demonstrando que o fungo está presente nas plantas. '+': controlo positivo

No tempo de recolha T0 verificou-se a amplificação em quatro das dez amostras testadas, existindo um pico de *melting* coincidente com o pico de amplificação do controlo positivo. Nas restantes seis amostras constatou-se que o seu pico de *melting* não coincidia com o pico de amplificação do fungo *C. nymphaeae*. Em T2 amplificaram com o seu pico de *melting* coincidente ao do fungo *C. nymphaeae* em cinco das seis amostras das plantas que em T0 não tiveram qualquer amplificação, sendo indicativo da infeção com o fungo *C. nymphaeae*. Este critério levou à decisão de seleccionar as plantas referenciadas com os números 3, 6, 7, 8 e 9, onde o fungo não foi identificado em T0 e simultaneamente identificado em T2 para os estudos de expressão génica (tabela 4.3).

Tabela 3. Valores Ct obtidos por qPCR de cada planta de oliveira ‘Galega vulgar’ recolhidas antes da inoculação (T0) e 35 dias após inoculação com o fungo *C. nymphaeae* (T2) e do fungo *C. nymphaeae* utilizado como controlo positivo. A verde estão indicadas as plantas seleccionadas de expressão, nas quais o fungo não foi identificado em T0 e simultaneamente identificado em T2. Ct: *Cycle Threshold*; N/D: não detetado

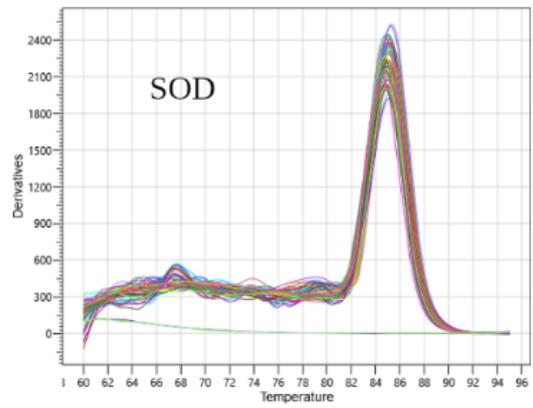
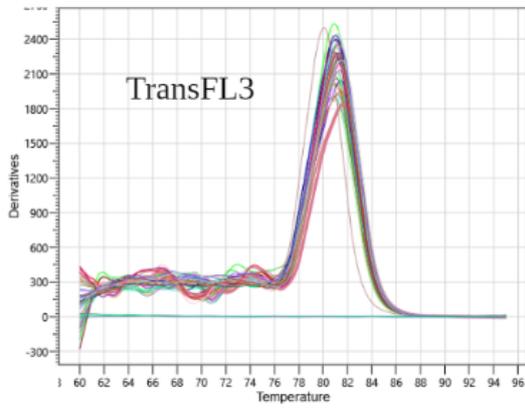
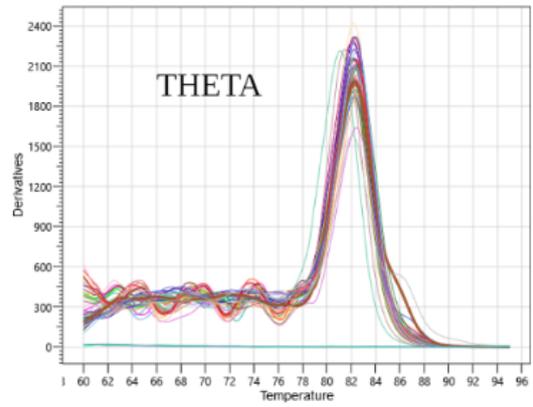
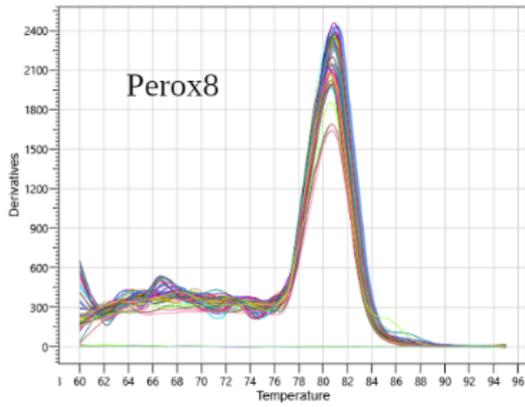
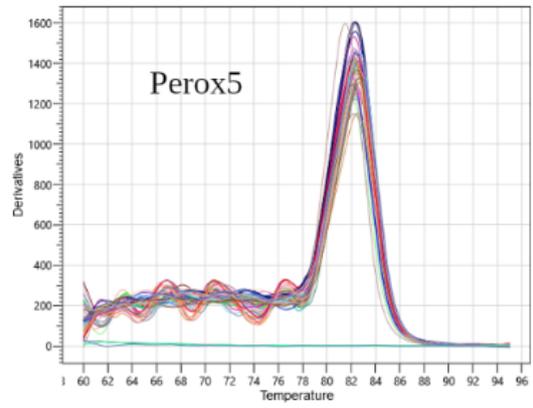
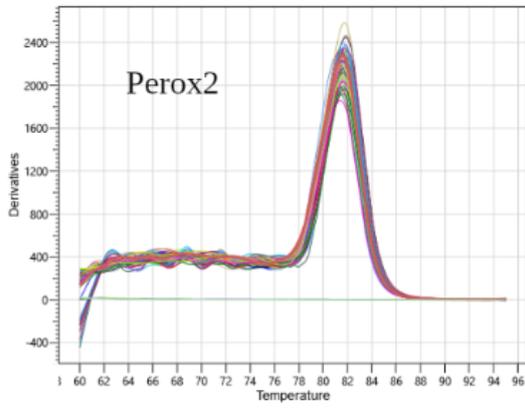
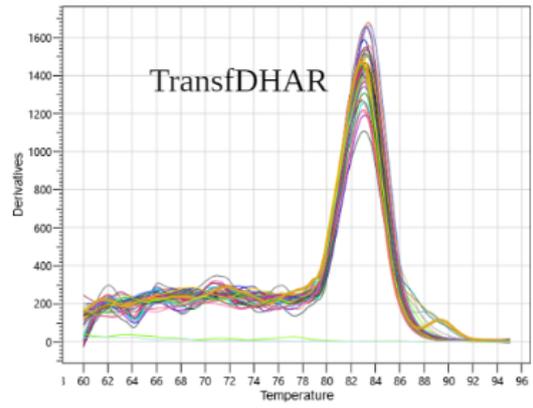
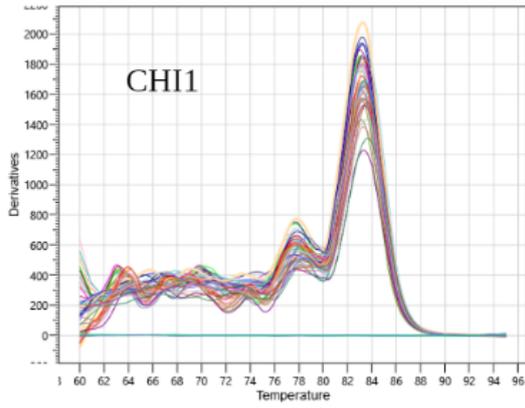
Planta	Tempo de amostragem	Ct	Tempo de amostragem	Ct
1	T0	34,75	T2	35,07
2	T0	37,2	T2	N/D
3	T0	N/D	T2	29,26
4	T0	35,52	T2	29,68
5	T0	N/D	T2	30,44
6	T0	N/D	T2	29,86
7	T0	N/D	T2	33,22
8	T0	N/D	T2	29,16
9	T0	N/D	T2	33,26
10	T0	33,52	T2	32,02
<i>C. nymphaeae</i> (controlo positivo)		10,83		

4.2 Resultados das análises de expressão genética por qPCR

Nas cinco plantas selecionadas e em cada um dos diferentes tempos de análise T0, T1 e T2, avaliou-se a qualidade do RNA pela determinação das absorvâncias. Os rácios 260/280 e 260/230 de valor superior a 1,8 são indicativos de boa qualidade de RNA (Rienth *et al.*, 2014). Avaliou-se a concentração do RNA que deverá ser superior a 60 ng/ μ l (apêndice B).

4.2.1 Avaliação da especificidade dos *primers*

Por avaliação da curva de *melting* foi avaliada para todos os pares de *primers* utilizados. O padrão da curva de *melting* correspondente ao máximo de especificidade corresponderá a um pico único, o qual indicará a temperatura de *melting* do amplicão para cada fragmento amplificado (Reed *et al.*, 2007). Foi verificada a existência de um único pico para cada combinação de *primers*, o que significa a amplificação de apenas um fragmento específico, confirmando-se desta forma a especificidade dos *primers* (figura 4.11).



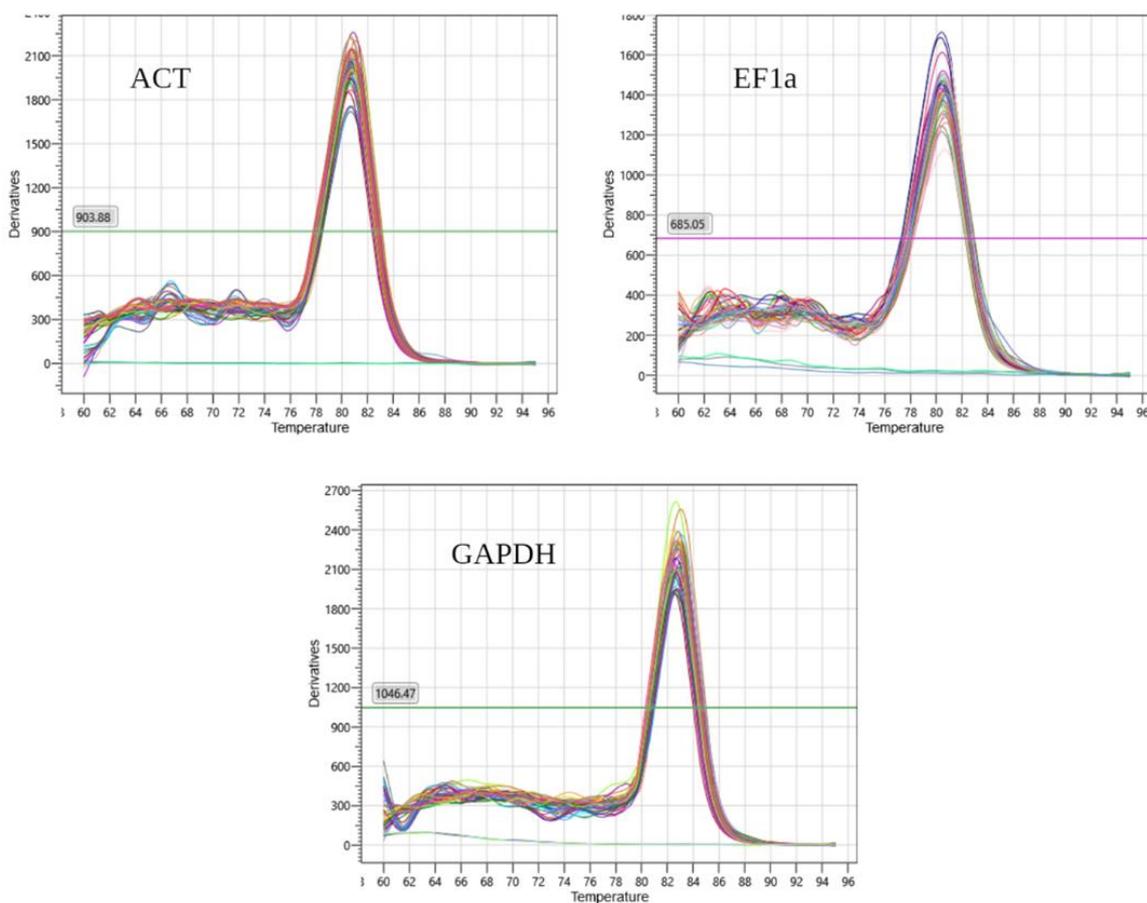


Figura 11. Especificidade dos *primers* avaliada pela análise dos picos de *melting*

4.2.2 Avaliação da linearidade e eficiência de amplificação dos *primers*

qPCR utiliza a linearidade da amplificação do RNA para determinar quantidades relativas da sequência conhecida em cada amostra. A avaliação da eficiência é um indicador auxiliar para verificar se a amplificação dos genes ocorreu de forma adequada. A faixa de eficiência ideal situa-se entre 90 % e 110 %, permitindo concluir que a eficiência ideal foi alcançada em todos os pares de *primers* (Bustin *et al.*, 2009), tendo obtido resultados de eficiência a variarem entre 93,81 % e 107,48 %. Os resultados do cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* encontram-se retratados na tabela 4.4.

Tabela 4. Avaliação da linearidade e eficiência de amplificação dos *primers* utilizados nos estudos de expressão gênica

Genes	Declive	Linearidade (R²)	Eficiência (%)
<i>ACT</i>	-3,4072	0,9989	96,56
<i>GAPDH</i>	-3,3856	0,9999	97,40
<i>EF1a</i>	-3,1547	0,9974	107,48
<i>SOD</i>	-3,4797	0,9994	93,81
<i>CHI1</i>	-3,4681	0,9743	94,24
<i>TransFL3</i>	-3,2284	0,9889	104,05
<i>PEROX2</i>	-3,1547	0,9626	102,73
<i>THETA</i>	-3,4376	0,9839	95,38
<i>TransfDHAR</i>	-3,1564	0,993	107,40
<i>PEROX5</i>	-3,4039	0,9985	96,68
<i>PEROX8</i>	-3,2173	0,7075	104,55

De modo a avaliar a estabilidade dos genes de referência utilizou-se o parâmetro M do software *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) que deverá ter um valor inferior a 1,5. Os resultados obtidos por este parâmetro foram os seguintes: a *ACT* = 0,747, o *GAPDH* = 0,903 e o *EF1a* = 0,716, ou seja, todos os genes testados são adequados para a normalização dos genes alvo.

4.2.3 Análise da expressão gênica

A análise da expressão dos genes alvo foi conduzida nas plantas de oliveira de cultivar ‘Galega vulgar’ antes e depois da infecção pelo fungo *C. nymphaeae*. Os valores de expressão relativos foram apresentados como a média (transformados em Log10) ± o erro padrão da média, obtidos a partir de três replicas técnicas para cada uma das cinco plantas, nos três tempos analisados: T0, T1 e T2. Os resultados dessa análise foram representados na figura 4.12.

A análise estatística da expressão dos genes para cada gene alvo permitiu comparar os valores de expressão dos genes (unidades arbitrárias normalizadas) ao longo do tempo do ensaio. Os genes *SOD*, *TransfDHAR* e *Perox5* não indicaram evidências estatísticas da expressão de genes ao longo do tempo do ensaio, ao apresentarem valores

de *p-value* superiores a 0,1. No caso dos genes *TransFL3*, *Perox2*, *THETA* e *Perox8* a análise demonstrou tendência ascendente ao apresentar um *p-value* maior que 0,05 e menor que 0,1. A análise de variâncias demonstrou diferenças significativas na expressão gênica entre os diferentes tempos analisados para o gene *CHII* com um valor de *p-value* de 0,024, com o T2 a apresentar um valor de expressão significativamente superior a T0 (apêndice C). As comparações múltiplas entre os tempos T0, T1 e T2, para o gene *CHII* detetaram valores unitários arbitrários significativamente mais elevados deste gene (T0 vs. T2 = 0,0266).

As comparações múltiplas para os genes *TransFL3*, *Perox2*, *THETA* e *Perox8* detetaram-se valores elevados significativamente diferentes, mas apenas estatisticamente significativos para valores de *p-value* entre 0,05 e 0,1: em *TransFL3* (T0 vs. T2 = 0,0702); em *THETA* (T1 vs. T2 = 0,0971); em *Perox2* (T0 vs. T2 = 0,0963); e em *Perox8* (T0 vs. T2 = 0,0903) (apêndice D).

As ROS têm um papel fundamental na ativação das defesas das plantas, induzindo alterações na expressão dos genes, perante o stress biótico e abiótico a que estão sujeitas. A produção de ROS resulta da resposta imunitária inata das plantas, que tem de ser suprimida pelo agente patogénico para evitar a ativação de defesas mais fortes da planta (Sahu *et al.*, 2022). A função das ROS já vem sendo associada a múltiplas tarefas dentro das defesas da planta como a transferência de vesículas, para a entrega de sinais de ROS em locais específicos, para a endocitose de recetores específicos durante a ativação da defesa e para a dessensibilização e reciclagem de recetores imunitários (Torres, 2010).

O gene *CHII*, pertencente à família das Quitinases desempenha um papel importante na resposta de defesa das plantas contra agentes patogénicos, nomeadamente fungos. A quitina, um polissacarídeo estrutural encontrado nas paredes celulares de muitos fungos, é uma componente chave na interação planta/patogénico (Kombrink & Thomma, 2013). As enzimas da família das Quitinases tem a capacidade de degradar a quitina (Mauch & Staehelin, 1989). Como tal na presença do fungo *C. nymphaeae* os sinais de defesa da planta foram acionados e por isso obteve-se uma expressão gerada em resposta à infeção ao longo do tempo do ensaio, indicando sua potencial importância na defesa da planta contra o agente patogénico (figura 4.12).

Os genes alvo, *TRANSFL3*, *THETA*, *Perox2* e *Perox8* (ver na figura 4.12), apresentaram tendência nos resultados estatísticos pertencem à mesma família de genes,

a família das Glutationas, são um dos principais antioxidantes endógenos das plantas, conhecido por desempenhar um papel importante nos mecanismos de defesa das plantas. Funcionando como substrato nos mecanismos de defesa antioxidante, conjugando-se com compostos eletrofílicos tóxicos, eliminando radicais livres e reduzindo peróxidos (Anderson & Davis, 2004). Podem estar ainda relacionados à produção de proteínas de resistência, incluindo proteínas envolvidas no reconhecimento e neutralização de agentes patogênicos. Essas proteínas desempenham um papel crucial na resposta das plantas, ativando respostas de defesa específicas para combater uma infecção (De Lorenzo *et al.*, 2011). A identificação desses genes pode vir a ser um avanço significativo, pois pode fornecer alvos potenciais para a engenharia genética visando aumentar a resistência da oliveira à antracnose.

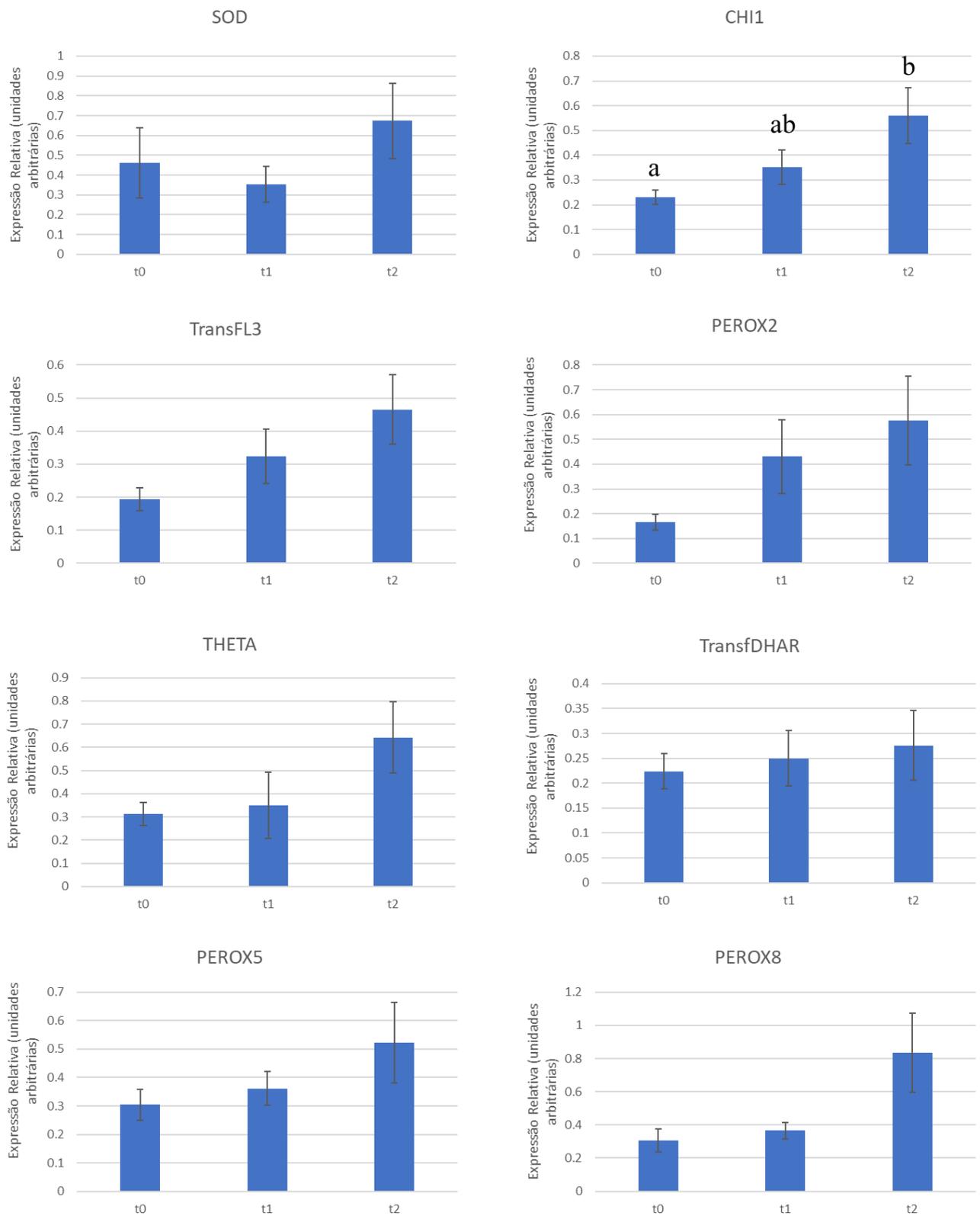


Figura 12. Expressão relativa dos genes com e sem a presença do fungo *C. nymphaeae* ao longo do ensaio onde T0 é antes da inoculação com o fungo *C. nymphaeae*, T1 é após 10 dias da inoculação das plantas e T2 é ao fim de 35 dias depois da exposição ao fungo

A antracnose da oliveira é amplamente reconhecida nos países produtores de azeitona, em particular em Portugal, especialmente nas regiões onde a cultivar 'Galega' é cultivada, uma vez que esta variedade apresenta uma alta suscetibilidade à doença, tendo em conta o cenário obvio de alterações climáticas e a constante adaptação dos agentes patogénicos ao clima e aos tratamentos fitossanitários. Tendo em conta estes factos, a identificação de genes potencialmente implicados na resposta da oliveira à infeção por agentes causadores de doença, nomeadamente *C. nymphaeae* reveste-se de importância significativa. Essa abordagem possibilita a compreensão da fundação genética subjacente à interação entre a oliveira e o *C. nymphaeae*, contribuindo assim com informações de grande relevância sobre os mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade da planta a essa infeção.

As ROS têm um papel central em situações de stress abiótico e biótico como o stress hídrico, salinidade excessiva do solo, perante altas temperaturas e na reação a patógenos. As ROS atuam como sinalizadores e mediadores de respostas envolvidas na ativação de mecanismos de defesa e adaptação a diferentes cenários.

De entre os genes-alvo estudados, o gene *CH11* revelou uma regulação positiva significativa ($p < 0,005$) entre T0 e T2 em resposta à infeção por *C. nymphaeae*, tornando-o um candidato promissor para ser posteriormente utilizado em análises funcionais.

Ao identificar os genes que estão envolvidos na resposta da oliveira à infeção por *C. nymphaeae*, torna-se possível obter informações sobre as vias metabólicas, processos de sinalização e mecanismos de defesa ativados durante a interação planta-patógeno. As informações podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e sustentáveis para o controlo da antracnose, como a seleção de variedades de oliveira mais resistentes ou o desenvolvimento de abordagens de controle biológico.

Salienta-se a importância deste estudo para a identificação de genes candidatos para incorporar novas fontes de resistência da oliveira à antracnose com a promoção do desenvolvimento de estratégias de gestão sustentáveis podendo facilitar a aplicação de técnicas de melhoramento genético, visando o desenvolvimento de variedades de oliveira com maior resistência à antracnose.

Embora os resultados deste estudo tenham fornecido informações importantes sobre os genes potencialmente envolvidos na resposta da oliveira à infeção por *C. nymphaeae*, é importante ressaltar que ainda há muito a ser explorado nessa área. Além disso, estudos

mais aprofundados são necessários para entender completamente os mecanismos moleculares envolvidos e sua interação.

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. (5th eds.) Elsevier academic Press. New York.
- Anderson, J. V., & Davis, D. G. (2004). Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum*, *120*(3), 421–433. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00249.x>
- Azevedo-Nogueira, F., Gomes, S., Lino, A., Carvalho, T., & Martins-Lopes, P. (2021). Real-time PCR assay for *Colletotrichum acutatum* sensu stricto quantification in olive fruit samples. *Food Chemistry*, *339*, 127858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127858>
- Bohm, J., Gouveia, J. (2013). Preâmbulo. O Grande Livro da Oliveira e do Azeite. Dinalivro, Lisboa, p. 24-25.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *60*(1), 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide Dismutase in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *13*(3), 199–218. <https://doi.org/10.1080/07352689409701914>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., & Dodds, P. N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: The “integrated decoy” hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00606>
- Chaki, M., Fernandez-Ocana, A. M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F. J., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M. V., Begara-Morales, J. C., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2009). Involvement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species (RNS and ROS) in

Sunflower-Mildew Interaction. *Plant and Cell Physiology*, 50(3), 665–679.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcp039>

Cordeiro A.M., Calado M.L., Morais N., Miranda A., & Carvalho M.T. (2010). ‘Galega vulgar’ – variedades de oliveira. INRB/ L-INIA/URGEMP.

Costa, L. C. D. (1937). O problema do azeite em Portugal. *Anais do Instituto Superior de Agronomia, Vol. 8, p. 63*.

De Lorenzo, G., Brutus, A., Savatin, D. V., Sicilia, F., & Cervone, F. (2011). Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Letters*, 585(11), 1521–1528.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.043>

De Oliveira, A. F., MdFP, B., Gonçalves, E. D., & Neto, J. V. (2008). Azeite de oliva: conceitos, classificação, usos e benefícios para a saúde humana. *Circular Técnica*, September.

De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. J. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>

del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078204>

DRABL (2005, setembro). Algumas características das variedades de Oliveira existentes em ensaio na estação Agrária de Viseu. https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/variedades_oliveiras.pdf

DRAP Centro: Olivicultura: A Cultura da Oliveira. (2018). <https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/olivicultura.php> (visitado no dia 15/06/2023)

Ensembl Plants. Disponível online: <https://plants.ensembl.org/index.html> (acedido a 28 de setembro de 2022)

FAOSTAT. (2019). Crops - Food and Agriculture Organization of the United Nations Stats. Obtido em 5 de outubro de 2023, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

- Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Carreras, A., Valderrama, R., Begara-Morales, J. C., Hernández, L. E., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2011). Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology*, *168*(11), 1303–1308. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.020>
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2013). ROS. *Current Biology*, *23*(3), R100–R102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.011>
- Gómez, J. M., Hernández, J. A., Jiménez, A., Del Río, L. A., & Sevilla, F. (1999). Differential Response of Antioxidative Enzymes of Chloroplasts and Mitochondria to Long-term NaCl Stress of Pea Plants. *Free Radical Research*, *31*(sup1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/10715769900301261>
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- International Olive Council (IOC). Disponivel online: <http://www.internationaloliveoil.org> (accedido a 18 de outubro de 2022).
- Instituto Nacional de Estatística (INE). (2021). Recenseamento Agrícola - Análise dos principais resultados – 2019
- Jafari, P., & Azuaje, F. (2006). An assessment of recently published gene expression data analyses: Reporting experimental design and statistical factors. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, *6*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1472-6947-6-27>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kasprzewska, A. N. N. A. (2003). Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *8*(3), 809-824.
- Kombrink, A., & Thomma, B. P. H. J. (2013). LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. *PLoS Pathogens*, *9*(12), e1003769. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003769>

- Langgut, D., Cheddadi, R., Carrión, JS, Cavanagh, M., Colombaroli, D., Eastwood, WJ, & Woodbridge, J. (2019). A origem e difusão do cultivo da oliveira na Bacia do Mediterrâneo: a evidência do pólen fóssil. *O Holoceno*, 29 (5), 902-922.
- Lopes, M. S., Mendonça, D., Sefc, K. M., Gil, F. S., & da Câmara Machado, A. (2004). Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *HortScience*, 39(7), 1562-1565.
- López-Escudero, F. J., Trapero, A., & Blanco-López, M. A. (2008). An overview of the research on verticillium wilt and other fungal diseases of olive in Spain. *Acta Horticulturae*, 791, 593–596. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.91>
- Marconi, T. G., Costa, E. A., Miranda, H. R., Mancini, M. C., Cardoso-Silva, C. B., Oliveira, K. M., ... & Souza, A. P. (2011). Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. *BMC Research Notes*, 4(1), 1-9.
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Campos, M. D., Rei, F., & Félix, M. D. R. (2018). Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Olive Anthracnose and New Perspectives on Controlling the Disease in Portugal. *Agronomy*, 8(12), 301. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120301>
- Mauch, F., & Staehelin, A. (1989). *Functional Implications of the Subcellular Localization of Ethylene-Induced Chitinase and β -1,3-Glucanase in Bean Leaves*.
- Moral, J., & Trapero, A. (2009). Assessing the Susceptibility of Olive Cultivars to Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 93(10), 1028–1036. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1028>
- O’Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., Damm, U., Buiate, E. A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C. A., Becker, C., Birren, B. W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J. A., Duvick, J. P., ... Vaillancourt, L. J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- Oliveira, H., Talhinhos, P., & Ferreira, P. (2003). Espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela gafa da oliveira em Portugal. ESA.

- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., & Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2–3), 186–198. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications, 21-34.
- Ray, D. L., & Johnson, J. C. (2014). Validation of reference genes for gene expression analysis in olive (*Olea europaea*) mesocarp tissue by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Research Notes*, 7(1), 1-12.
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>
- Rodrigues, M. Â., & Correia, C. M. (2009). Manual da safra e contra a safra do olival. Bragança: Instituto Politécnico.
- Sahu, P. K., Jayalakshmi, K., Tilgam, J., Gupta, A., Nagaraju, Y., Kumar, A., ... & Rajawat, M. V. S. (2022). ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1042936.
- Sales, H., Nunes, J., & Vaz Patto, M. C. (2020). Achievements and Challenges towards a Sustainable Conservation and Use of ‘Galega vulgar’ *Olea europaea* Variety. *Agronomy*, 10(10), 1467. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101467>
- Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: Geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, 110(1), 109–198. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>
- Talhinhas, P., Gonçalves, E., Sreenivasaprasad, S., & Oliveira, H. (2015). Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 142(1), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0590-7>

- Talhinhas, P., Loureiro, A., & Oliveira, H. (2018). Olive anthracnose: A yield- and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution: The olive anthracnose pathogens, *Colletotrichum* spp. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1797–1807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12676>
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414–429. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>
- Vandesompele, J., Preter, K. D., Roy, N. V., & Paepe, A. D. (2002). *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.*
- Velada, I., Grzebelus, D., Lousa, D., M. Soares, C., Santos Macedo, E., Peixe, A., ... & G. Cardoso, H. (2018). AOX1-subfamily gene members in olea europaea cv. “Galega vulgar”—gene characterization and expression of transcripts during IBA-induced in vitro adventitious rooting. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 597.
- Wharton, P. S., & Diéguez-Uribeondo, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of botany*, 92(4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D. G. O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S. A., & Kamoun, S. (2012). Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77(0), 235–247. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.015933>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>
- Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543(7645), 328–336. <https://doi.org/10.1038/nature22009>

Apêndice A: Resultados de concentração e avaliação da qualidade do gDNA das amostras.

Análise do gDNA			
Amostras	Concentração (ng/μl)	260/280	260/230
T0-3	13.85	1.314	1.238
T0-6	16.8	1.355	0.828
T0-7	13.5	1.28	0.701
T0-8	11.3	1.245	0.621
T0-9	20.35	1.433	0.774
Fungo	33.2	1.809	0.377
T2-3	25.6	1.395	0.287
T2-6	12.5	1.605	1.25
T2-7	15.8	1.519	1.097
T2-8	12.2	1.452	0.968
T2-9	9.2	1.6	1.957

Apêndice B: Resultados das análises de RNA.

Análise do RNA			
Amostras	Concentração (ng/μl)	260/280	260/230
T0-3	183.6	2.141	1.603
T0-6	228.28	2.122	2.043
T0-7	91.8	2.027	1.193
T0-8	81.4	1.995	0.65
T0-9	353.2	2.105	1.937
T1-3	184.32	2.073	1.064
T1-6	86.24	2.053	1.085
T1-7	93.32	1.987	1.232
T1-8	85.84	1.987	0.551
T1-9	100.08	2.003	0.989
T2-3	117.68	2.057	1.095
T2-6	232.68	2.035	0.562
T2-7	92.88	1.849	0.826
T2-8	108.12	1.91	0.32
T2-9	147.12	1.664	0.641

Apêndice C: Resultados da análise estatística ANOVA no software IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows, version 21.0, Armonk, NY IBM Corp) com um nível de significância definido como $p < 0.05$.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SOD	Between Groups	.362	2	.181	1.458	.274
	Within Groups	1.363	11	.124		
	Total	1.725	13			
CHI1	Between Groups	.299	2	.150	5.566	.021
	Within Groups	.295	11	.027		
	Total	.594	13			
TransFL3	Between Groups	.198	2	.099	3.740	.058
	Within Groups	.292	11	.027		
	Total	.490	13			
PEROX2	Between Groups	.434	2	.217	3.110	.085
	Within Groups	.768	11	.070		
	Total	1.203	13			
THETA	Between Groups	.389	2	.194	3.875	.053
	Within Groups	.552	11	.050		
	Total	.940	13			
TransfDHAR	Between Groups	.010	2	.005	.340	.719
	Within Groups	.165	11	.015		
	Total	.175	13			
PEROX5	Between Groups	.147	2	.074	1.669	.233
	Within Groups	.485	11	.044		
	Total	.632	13			
PEROX8	Between Groups	.884	2	.442	3.902	.052
	Within Groups	1.247	11	.113		
	Total	2.131	13			

Apêndice D: Resultados das análises das comparações múltiplas, através do teste de Bonferroni.

Multiple Comparisons							
Bonferroni							
Dependent Variable		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
SOD	T0	T1	.189254	.236175	1.000	-.47677	.85528
		T2	-.212039	.222668	1.000	-.83997	.41589
	T1	T0	-.189254	.236175	1.000	-.85528	.47677
		T2	-.401293	.236175	.352	-1.06731	.26473
	T2	T0	.212039	.222668	1.000	-.41589	.83997
		T1	.401293	.236175	.352	-.26473	1.06731
CHI1	T0	T1	-.063887	.109941	1.000	-.37392	.24615
		T2	-.328733*	.103653	.027	-.62104	-.03643
	T1	T0	.063887	.109941	1.000	-.24615	.37392
		T2	-.264846	.109941	.104	-.57488	.04519
	T2	T0	.328733*	.103653	.027	.03643	.62104
		T1	.264846	.109941	.104	-.04519	.57488
TransFL3	T0	T1	-.062993	.109258	1.000	-.37110	.24512
		T2	-.270875	.103010	.070	-.56137	.01962
	T1	T0	.062993	.109258	1.000	-.24512	.37110
		T2	-.207882	.109258	.251	-.51599	.10023
	T2	T0	.270875	.103010	.070	-.01962	.56137
		T1	.207882	.109258	.251	-.10023	.51599
PEROX2	T0	T1	-.133939	.177280	1.000	-.63387	.36600
		T2	-.409871	.167141	.096	-.88121	.06147
	T1	T0	.133939	.177280	1.000	-.36600	.63387
		T2	-.275932	.177280	.444	-.77587	.22400
	T2	T0	.409871	.167141	.096	-.06147	.88121
		T1	.275932	.177280	.444	-.22400	.77587
THETA	T0	T1	.038557	.150237	1.000	-.38512	.46223
		T2	-.329122	.141644	.121	-.72856	.07032
	T1	T0	-.038557	.150237	1.000	-.46223	.38512
		T2	-.367679	.150237	.097	-.79135	.05599
	T2	T0	.329122	.141644	.121	-.07032	.72856
		T1	.367679	.150237	.097	-.05599	.79135
TransfDHAR	T0	T1	.009279	.082109	1.000	-.22227	.24083
		T2	-.051631	.077413	1.000	-.26994	.16668
	T1	T0	-.009279	.082109	1.000	-.24083	.22227
		T2	-.060910	.082109	1.000	-.29246	.17064
	T2	T0	.051631	.077413	1.000	-.16668	.26994
		T1	.060910	.082109	1.000	-.17064	.29246
PEROX5	T0	T1	-.011631	.140821	1.000	-.40875	.38549
		T2	-.218888	.132767	.382	-.59330	.15552
	T1	T0	.011631	.140821	1.000	-.38549	.40875
		T2	-.207257	.140821	.507	-.60438	.18986
	T2	T0	.218888	.132767	.382	-.15552	.59330
		T1	.207257	.140821	.507	-.18986	.60438
PEROX8	T0	T1	-.012053	.225819	1.000	-.64887	.62476
		T2	-.529792	.212904	.090	-1.13019	.07060
	T1	T0	.012053	.225819	1.000	-.62476	.64887
		T2	-.517738	.225819	.128	-1.15455	.11908
	T2	T0	.529792	.212904	.090	-.07060	1.13019
		T1	.517738	.225819	.128	-.11908	1.15455