



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL

Etiologia e epidemiologia associadas à mortalidade da amendoeira em pomares super-intensivos no Alentejo

Cláudio Miguel Parrano dos Santos

Orientação:

Doutor Patrick Materatski

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL

Etiologia e epidemiologia associadas à mortalidade da amendoeira em pomares super-intensivos no Alentejo

Cláudio Miguel Parrano dos Santos

Orientação:

Doutor Patrick Materatski

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2018

Esta dissertação foi cofinanciada por:



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional



GAFAPROTECT - ALT20-03-0145-FEDER-028263

TOMVIRPROTECT - ALT20-03-0145-FEDER-028266

Agradecimentos

Por toda a paciência, por toda a motivação que me foram dando ao longo destes meses, por todo o conhecimento que me transmitiram e por toda a disponibilidade que tiveram para me ouvir e me ajudar sempre, gostava de começar por agradecer aos meus orientadores, o Doutor Patrick Materatski e a Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix. Foram sem dúvida as melhores pessoas para me ajudar a chegar ao objetivo final com sucesso.

Queria também agradecer os meus pais, Mário e Silvina, à minha namorada Francisca, à minha filha Maria Margarida

A todos os que partilharam comigo o laboratório durante estes meses pela ajuda que me deram quando mais precisei, e que me ajudaram a passar o tempo de forma mais tranquila e alegre.

Ao Miguel Madeira e ao Eng. José Maria Falcão pela disponibilidade que tiveram para me ajudar durante a recolha das amostras e a fornecerem-me sempre os dados que precisei durante este trabalho.

Ao Jorge Saragoça e ao Rui Queirós que passaram um dia comigo ao sol a recolher amostras sem parar e sem pedir nada em troca.

Ao Francisco Mendonça pelas horas de estudo e sofrimento, mas também de alegria que partilhou comigo e com quem tive a alegria que começar esta espetacular etapa da minha vida e a todos os meus amigos que me ajudaram durante estes 2 anos.

Este trabalho foi financiado pelo projeto “Controle da antracnose da oliveira através de silenciamento e expressão de genes utilizando um vírus de planta como vector” com a referência ALT20-03-0145-FEDER-028263 e pelo projeto “Desenvolvimento de um vetor para proteção de plantas de tomate contra TSWV” com a referência ALT20-03-0145-FEDER-028266, cofinanciados pela União Europeia através do Fundo de Desenvolvimento Regional Europeu, ALENTEJO2020 (Programa Regional Operacional do Alentejo), ALGARVE2020 (Programa Regional Operacional do Algarve) e através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, na sua componente nacional.

Resumo

Neste trabalho foram analisadas jovens plantas de amendoeira das cultivares *Lauranne Avijor* e *Soleta*, com sintomas de doença e assintomáticas, situadas em dois locais da Região do Alentejo, em modo de exploração super-intensivo. Todas as árvores foram testadas em três órgãos vegetativos distintos, raízes, tronco e folhas, bem como os solos em que estavam plantas e a água utilizada na rega. Os fungos fitopatogénicos mais encontrados nas amostras de planta foram os pertencentes aos géneros *Fusarium* e *Alternaria* e ainda a espécie *Macrophomina phaseolina*. Fungos do género *Fusarium* foram também encontrados tanto no solo como na água de rega, podendo dar uma indicação quanto à fonte de inóculo das plantas. Verificou-se ainda que as mesmas cultivares de planta, com a mesma proveniência, apresentam diferentes microbiomas de acordo com os locais onde estão instaladas e que estes podem contribuir decisivamente para a manifestação ou não de sintomas de doença.

PALAVRAS-CHAVE: Amendoeira; Gomose; Amendoal super-intensivo; *Soleta*; *Lauranne Avijor*

Abstract – Etiology and epidemiology causing mortality in super-intensive almond trees orchards in Alentejo region

In this work, young almond plants of the cultivars *Lauranne Avijor* and *Soleta* with disease symptoms and asymptomatic, located in two Alentejo regions, under a super-intensive mode management, were analyzed for the presence of fungi. Three distinct vegetative organs, roots, trunk and leaves of trees, as well as the soils on which plants were installed and water used for irrigation were tested. The phytopathogenic fungi most found in the plant samples belonged to genera *Fusarium* and *Alternaria* and also to the species *Macrophomina phaseolina*. *Fusarium* spp. were also found in both soil and irrigation water which may give an indication of the source of inoculum. It was also verified that the same plant cultivars, with the same provenance, present a different microbiome according to the places where they are installed which can contribute decisively for the manifestation of symptoms of disease.

KEYWORDS: Almond tree, Gummosis, Super-intensive almond tree orchard, *Soleta*, *Lauranne Avijor*

Abreviaturas

°C - Grau centígrado

% - Percentagem

μL - Microlitros

μM - Micromolar

BLAST - Basic Local Alignment Search Tools

CASS - California Agricultural Statistics Service

Cm – Centímetros

CTAB - Cetyl trimethyl ammonium bromide

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

ESRI - Environmental Systems Research Institute

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division

h – Hora(s)

ha - Hectares

ITS - Internal Transcribed Spacer

km - Quilómetros

kPa - Kilopascal

L - Litros

m – Metros

min – Minuto(s)

mL - Mililitro

mm - Milímetros

mM - Milimolar

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OTUs – Operational Taxonomic Unit

PCR - Polymerase Chain Reaction

PDA - Potato dextrose agar

PVP – Polivinilpirrolidona

rpm - Rotações por minute

spp. - Espécies

Ton - Toneladas

U – Unidades

v/v - Volume/Volume

Bases nucleótidas

A - Adenina

C - Citosina

G - Guanina

T - Timina

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract – Etiology and epidemiology causing mortality in super-intensive almond trees orchards in Alentejo region	iii
Abreviaturas.....	iv
Índice Geral	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Quadros.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Apresentação e Relevância do Estudo.....	2
1.2. Problema e Questões do Estudo.....	2
1.3. Objetivo e hipóteses.....	3
1.4. Organização do Trabalho.....	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. A Amendoeira.....	6
2.1.1. Classificação Taxonómica.....	6
2.1.2. Características botânicas.....	7
2.1.3. Ciclo Não Produtivo.....	7
2.1.4. Ciclo Produtivo.....	8
2.1.5. Condições de Crescimento.....	9
2.2. Importância económica e comércio da amêndoa a nível Mundial.....	10
2.3. A cultura da amendoeira no mundo e em Portugal	12
2.4. Principais doenças das Prunóideas.....	17
2.4.1. As principais doenças da amendoeira	17
2.5. Fungos Endofíticos.....	32
3. Materiais e Métodos.....	36
3.1. Apresentação e caracterização das parcelas em estudo.....	37
3.1.1. Localização dos locais de amostragem	37
3.1.2. Condições edafo-climáticas de Portalegre e de Évora.....	38
3.1.3. Sistemas de rega nos locais utilizados nos locais A e B	44
3.2. Descrição do Problema e seleção do material vegetal.....	46
3.3. Recolha de material vegetal.....	47

3.4.	Recolha de material edáfico	48
3.5.	Recolha de água de rega	49
3.6.	Isolamento de microrganismos provenientes do material vegetal	49
3.7.	Isolamento de microrganismos provenientes do material edáfico	51
3.8.	Isolamento de microrganismos presentes na água de rega.....	52
3.9.	Identificação molecular dos microrganismos isolados no material vegetal, edáfico e água de rega	52
3.10.	Análise estatística	55
4.	Resultados	57
4.1.	Isolamento e identificação de isolados de fungos obtidos no material vegetal.....	58
4.2.	Isolamento e identificação de <i>Fusarium</i> spp. no material edáfico	59
4.3.	Isolamento e identificação de <i>Fusarium</i> spp. na água de rega	63
4.4.	Diversidade de fungos endofíticos encontrada nas plantas	64
4.5.	Análise da abundância de fungos endofíticos encontrada nas plantas.....	70
5.	Discussão de Resultados.....	75
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras	82
7.	Referências.....	85
8.	Anexos	96

Índice de Figuras

Figura 1 - Produção total da quantidade de amêndoa com casca a nível mundial (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Figura 2 - Top 10 de países na produção de amêndoa com casca (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Figura 3 - Produção de amêndoa com casca por continente (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Figura 4 - Produção total da quantidade de amêndoa com casca em Portugal (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Figura 5 - Superfície e produção de amêndoa em Portugal (Adaptado de Estatísticas Agrícolas, 2016).

Figura 6 - Produção de amêndoa em Portugal de 2012 a 2016 e média de produção durante o mesmo período (Fonte: INE I.P., Estatística de Produção Vegetal).

Figura 7 - Superfície plantada e produções para amêndoa nas diferentes regiões do país, para o ano de 2016 (Fonte: Adaptado de Estatísticas Agrícolas, 2016).

Figura 8 - Triângulo da doença com os três fatores que em conjuntos provocam o aparecimento da doença (Fonte: Agrios, 2005).

Figura 9 - Folhas (A) e frutos (B) de prunóideas com sintomas de crivado (A - Fonte: <https://www.flickr.com/photos/hermesalmond/5355220118>; B - Fonte: <https://www.flickr.com/photos/hermesalmond/5354603207>).

Figura 10 - Ciclo da doença de Crivado causado por *Stigmina carpophila* (Adaptado de <http://mevazor.uz/en/diseases/type/3/item/2/>).

Figura 11 - Botões florais (A), frutos (B) e frutos mumificados (C) afetados por Moniliose (A e C - Fonte: Agrios, 2005; B - Fonte: <https://plantvillage.psu.edu/topics/almond/infos>).

Figura 12 - Ciclo da doença de Moniliose causado por *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* ou *Monilinia fructigena* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 13 - Folhas (A e B) e frutos (A) afetados por Lepra (Fonte: <https://www.shutterstock.com/search/taphrina>).

Figura 14 - Ciclo da doença de Lepra causado por *Taphrina deformans* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 15 - Frutos (A) e folhas (B) com sintomas de Oídio (Powdery Mildew) (Fonte: <https://agrobasesapp.com/united-states/disease/powdery-mildew-of-almonds>).

Figura 16 - Aparecimento de esporos em zona com necrose (Fonte: Marek et al., 2013).

Figura 17 - Ciclo da doença de Fusariose causado por *Fusarium* *Fusarium* *avenaceum*, *Fusarium* *acuminatum* e *Fusarium* *solani* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 18 - Sintomas de doenças do lenho em amendoeiras (Fonte: <https://flotrouillas.faculty.ucdavis.edu/research-projects/>).

Figura 19 - Hipótese explicativa para o estabelecimento de relações mutualista ou parasitas entre um fungo endofítico e uma planta hospedeira (Adaptado de Schulz *et al.*, 2006).

Figura 20 - Parcela em estudo no local A.

Figura 21 - Parcela em estudo no local B.

Figura 22 - Gráfico termopluviométrico de Portalegre (Fonte: <https://pt.climate-data.org/location/138/>).

Figura 23 - Gráfico termopluviométrico de Évora (Fonte: <https://pt.climate-data.org/location/135/>).

Figura 24 - Classificação Portuguesa dos Sistema de Rega (Fonte: Raposo, 1997).

Figura 25 - Exemplo de rega gota-a-gota com uma fita de emissores no local B.

Figura 26 - Valores indicativos das eficiências de aplicação para sistemas de rega bem projetados e bem mantidos (Fonte: Pereira, 2004).

Figura 27 - Exemplo das sintomatologias encontrada em amendoeiras jovens presentes nos locais A e B e nas cultivares *Lauranne Avijor* e *Soleta*.

Figura 28 - Esquema da recolha de amostras de material vegetativo no local A.

Figura 29 - Ciclo de desinfeção do material vegetal.

Figura 30 - Fracionamento do material edáfico.

Figura 31 - Placa de Petri de 90 mm identificada e após o crescimento de microrganismos.

Figura 32 - Amostras de material edáfico em suspensão.

Figura 33 - Utilização de azoto líquido para a maceração dos microorganismos.

Figura 34 - Colocação de um microrganismo macerado num microtubo de 2 mL.

Figura 35 - Região de rDNA com a localização dos primers ITS1 e ITS4 (Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Location-of-Internal-Transcribed-Spacer-sequence-1-2-a-and-the-position-of-primers_fig1_270564947).

Figura 36 - Análise electroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos

de amplificação da região ITS, tendo-se utilizado os primers universais ITS1 e ITS4, usando DNA extraído (1 a 14) de fungos isolados de amostras de material vegetal; - - controlo negativo; M – marcador GeneRuler 1 Kpb plus DNA Ladder; resultante num produto com o tamanho esperado entre 500 e 700 pb.

Figura 37 - Análise electroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos de amplificação de uma porção do gene da β -Tubulina, usando DNA extraído (1 a 7) de fungos isolados de amostras de material vegetal; - - controlo negativo; M – marcador GeneRuler 1 Kpb plus DNA Ladder; resultante num produto com o tamanho esperado de 1500 pb.

Figura 38 - Número total de isolados e espécies de *Fusarium* presentes no material edáfico no local A e no local B.

Figura 39 - Número de isolados e espécies de *Fusarium* obtidos, por cultivar, presentes no material edáfico no local A.

Figura 40 - Número de isolados e espécies de *Fusarium* obtidos por cultivar, presentes no material edáfico no local B.

Figura 41 - Número de isolados e espécies de *Fusarium*, por cultivar sintomática e não sintomática, presentes no material edáfico no local A.

Figura 42 - Número de isolados e espécies de *Fusarium*, por cultivar sintomática e não sintomática, presentes no material edáfico no local B.

Figura 43 - Ausência (0) e presença (1) das diferentes espécies de *Fusarium* na água utilizada para a rega das plantas do local A e do local B.

Figura 44 - Isolados encontrados no material vegetal e obtidos em cultura pura; A - *Epicoccum*; B - *Trichoderma*; C - *Trichothecium*; D - *Purpureocillium*; E - *Fusarium*; F - *Alternaria*; G - *Curvularia*; H - *Aspergillus*; I - *Aureobasidium*; J - *Botrytis*; L - *Cladosporium*; M - *Penicillium*.

Figura 45 - Isolados encontrados no material vegetal e obtidos em cultura pura; A - *Phoma*; B - *Rhizopus*; C - *Boeremia*; D - *Bjerkandera*; E - *Truncatella*; F - *Talaromyces*; G - *Preussia*; H - *Byssochamys*; I - *Pseudogymnoascus*; J - *Diaporthe*; L - *Macrophomina*; M - *Umbelopsis*.

Figura 46 - Isolados encontrados no material vegetal e obtidos em cultura pura; A - *Ilyonectria*; B - *Chaetomium*; C - Não identificado.

Figura 47 - Número de isolados de cada espécie após o BLAST.

Figura 48 - Média de abundância de fungos encontrados nas plantas do local A e respectivo erro padrão.

Figura 49 - Média de abundância de fungos encontrados nas plantas do local B e respectivo erro padrão.

Índice de Quadros

Quadro 1 - Enquadramento taxonómico da família das Rosáceas (Fonte: Almeida, 2013).

Quadro 2 - Principais países exportadores de amêndoa (sem e com casca) em toneladas (Fonte: Adaptado de <http://www.cif-businessintelligence.com/>).

Quadro 3 - Principais países/regiões produtores de amêndoa entre 2010/11 e 2015/16, em toneladas (Fonte: Adaptado de <http://www.cif-businessintelligence.com/>).

Quadro 4 - Principais países/regiões consumidores de amêndoa entre 2010/11 e 2015/16, em toneladas (Fonte: Adaptado de <http://www.cif-businessintelligence.com/>).

Quadro 5 - Dados relativos à temperatura do ar e à precipitação na estação meteorológica de Portalegre entre os anos de 1971 e 2000 (Fonte: Instituto Português do Mar e da Atmosfera).

Quadro 6 - Dados relativos à temperatura do ar e à precipitação na estação meteorológica de Évora entre os anos de 1971 e 2000 (Fonte: Instituto Português do Mar e da Atmosfera).

Quadro 7 - Identificação dos isolados de *Fusarium* por local (A e B), por cultivar (*Lauranne* e *Soleta*) e por sintomatologia (Sintomáticas e assintomáticas).

Quadro 8 - Ausência (0) e presença (1) dos diferentes isolados de *Fusarium* na água utilizada para a rega nos locais A e B.

Quadro 9 - Diversidade de fungos identificados após a análise BLAST N das sequências nucleóticas e número total de isolados de fungos por órgão vegetativo.

1. Introdução

1.1. Apresentação e Relevância do Estudo

Nos dias de hoje, a sociedade está cada vez mais preocupada com o bem-estar físico, e com aquilo que deve ou não comer. Para isso, cada vez mais a mentalidade no que diz respeito à alimentação tem sido alterada pela população mundial, que cada vez mais se concentra num estilo de vida e alimentação mais saudáveis, deixando de consumir ou reduzindo o consumo de alguns alimentos como por exemplo o sal, o açúcar e as carnes gordas.

Devido a este tipo de alterações, também os agricultores alteraram o seu método e mudaram o seu foco de produção para os produtos ditos mais saudáveis, como por exemplo os legumes frescos, as hortaliças, os vegetais e os frutos secos.

Uma das culturas que está, ano após ano, a ganhar mais importância nesta nova forma de alimentação é a amêndoa, que pertence à família *Rosaceae* e à sub-família *Amygdaloideae*, devido às suas propriedades nutricionais, como por exemplo o facto de contribuir para a redução do colesterol e de ser anticancerígena (<https://www.medicalnewstoday.com>). A cultura da amêndoa tem tido um aumento significativo na Europa (Itália e Espanha) e mais recentemente em Portugal. De facto, Portugal apresenta nos últimos anos um aumento no número de hectares plantados (Estatísticas Agrícolas, 2016), este grande investimento na cultura, tem como exemplo a criação de uma unidade de transformação no Alentejo.

1.2. Problema e Questões do Estudo

Em abril do ano de 2016 foram instalados, em dois distritos de Portugal (Distrito de Portalegre e Distrito de Évora) ambos na região do Alentejo, dois amendoais em modo de exploração super-intensivo. No entanto, no ano de 2017 começaram a aparecer os primeiros problemas fitossanitários nas amendoeiras das cultivares *Lauranne Avijor* e a *Soleta*, ambas cultivares europeias, tendo a primeira origem francesa e a segunda origem espanhola. Estas sintomatologias, nas diversas árvores foram, num primeiro momento, típicas de carência hídrica, em que as árvores apresentavam folhas e ramos secos. Observou-se mais tarde que, os sintomas começaram por manifestar-se nos ramos superiores das árvores afetadas, iniciando-se com uma clorose, seguida de necrose e queda das folhas. Cortes transversais nos ramos superiores revelaram anéis necróticos no interior do lenho. Os sintomas passavam também para o tronco, com o aparecimento de

várias gomoses, levando à morte generalizada das árvores jovens. O problema em estudo neste trabalho, está relacionado com a identificação dos organismos endofíticos e dos possíveis agentes fitopatogénicos que possam estar associados ao declínio das amendoeiras jovens.

Sendo assim as principais questões científicas em estudo são:

1. Quais serão os agentes fitopatogénicos associados ao declínio das amendoeiras jovens?
2. Quais serão os organismos endofíticos associados às amendoeiras jovens?
3. Quais os fatores ambientais que poderão ter influência no aparecimento destas doenças?

1.3. Objetivo e hipóteses

O objetivo deste trabalho foi investigar os organismos patogénicos e endofíticos associados ao declínio de plantas de amendoeira (*Prunus dulcis*), e qual a sua etiologia e epidemiologia, através da análise de: i) dois locais, um no distrito de Portalegre e outro no distrito de Évora (local A e B, respetivamente); ii) duas cultivares (*Lauranne Avijor e Soleta*); iii) em cada cultivar plantas sintomáticas e assintomáticas; iii) e nos diferentes órgãos das plantas (raiz, tronco e folhas). Foram testadas as seguintes hipóteses de trabalho: i) haverá diferenças entre a abundância e a diversidade dos organismos fitopatogénicos e endofíticos entre os locais (A e B); ii) haverá diferenças entre a abundância e a diversidade dos organismos fitopatogénicos e endofíticos entre as duas cultivares (*Lauranne Avijor e Soleta*); iii) haverá diferenças entre a abundância e a diversidade dos organismos fitopatogénicos e endofíticos entre as plantas sintomáticas e assintomáticas; iv) e haverá diferenças entre a abundância e a diversidade dos organismos fitopatogénicos e endofíticos nos diferentes órgãos das plantas (raiz, tronco e folhas).

1.4. Organização do Trabalho

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos, sendo que estes capítulos são antecedidos pelo resumo do trabalho nas línguas inglesa e portuguesa, o índice geral do trabalho, o índice de figuras e o índice de quadros.

O primeiro capítulo é a introdução, que está dividida em quatro partes: a

apresentação e relevância do estudo, em que se explicam as razões da escolha do tema, o objetivo do estudo e as questões que orientaram o mesmo, e por fim a organização do trabalho.

O segundo capítulo é a revisão bibliográfica, onde se descreve a cultura da amendoeira a nível mundial e ibérico, onde se faz uma breve caracterização da cultura e da sua importância económica, a apresentação e descrição das principais doenças causadas por fungos nas prunoideas e uma descrição da comunidade de fungos endofíticos presentes nestas plantas.

O terceiro capítulo são os materiais e métodos, onde se descrevem os procedimentos que foram realizados durante o estudo.

O quarto capítulo são os resultados, onde se apresentam os resultados obtidos após o trabalho.

O quinto capítulo, a discussão, é dedicado à explanação dos resultados obtidos e à discussão dos mesmos.

O sexto capítulo são as conclusões e as prespetivas futuras, em que se retiram as conclusões do trabalho e se apresentam ideias para trabalhos futuros.

As referências bibliográficas e os anexos são apresentados no final.

2. Revisão Bibliográfica

2.1.A Amendoeira

2.1.1. Classificação Taxonómica

A amendoeira pertence à família *Rosaceae*, pertencente à ordem *Rosales*, incluída na subclasse *Rosidae* de Cronquist (Quadro 1). A família das *Rosaceae* é considerada monofilética, apesar de existir uma grande diversidade morfológica e anatómica nestes *taxa*. Esta família é composta aproximadamente por 85 géneros e 3000 espécies, distribuídas principalmente pelas regiões temperadas do Hemisfério Norte e nela estão incluídas várias espécies com interesse agronómico e económico, como as fruteiras de climas temperados. Apesar de existirem algumas espécies herbáceas, a família é maioritariamente constituída por espécies lenhosas (Almeida, 2014).

Quadro 1 - Enquadramento taxonómico da família das Rosáceas (Fonte: Almeida, 2013).

Reino	<i>Plantae</i>
Sub-Reino	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)
Superdivisão	<i>Spermatophyta</i> (Plantas com semente)
Divisão	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospérmicas)
Classe	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclasse	<i>Rosidae</i>
Ordem	<i>Rosales</i>
Família	<i>Rosaceae</i>

Segundo Schulze-Menz (1964) e Almeida (2014), tendo por base a anatomia dos frutos, é possível dividir as rosáceas por quatro subfamílias:

1. *Maloideae* (sin. *Pomoideae*), que inclui as espécies com pseudofrutos carnudos, designados por pomos, em que o hipanto se encontra fundido com a parede do ovário. Nesta subfamília incluem-se as fruteiras *Malus domestica* (macieiras), *Pyrus communis* (pereira) e *Cydonia oblonga* (marmeleiro).
2. *Amygdaloideae* (sin. *Prunoideae*), que inclui todas as rosáceas cujos frutos são drupas, de entre as quais se destacam as fruteiras do género *Prunus*: *P. persica* (pessegueiro), *P. domestica* (ameixeira europeia), *P. dulcis* (amendoeira), *P. armeniaca* (damasco), *P. avium* (cerejeira) e *P. cerasus* (ginjeira).

3. *Rosoideae*, ao contrário das subfamílias anteriores, em que existe uniformidade no tipo de fruto, os frutos das espécies de *Rosoideae* podem ser aquênios ou pluridrupas. Incluem-se nesta subfamília os gêneros *Fragaria* (morango), *Rosa* (roseiras) e *Rubus* (amoras e framboesas).
4. *Spiraeoideae*. Agrupamento não monofilético onde tradicionalmente se incluem as rosáceas cujo fruto é um folículo ou cápsula, como, por exemplo, as plantas ornamentais do gênero *Spiraea*.

2.1.2. Características botânicas

Na família das rosáceas, e mais precisamente na sub-família das *Amygdaloideae* é onde estão incluídos os frutos secos, como é o caso da amendoeira (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb), sin. *Prunus amygdalus* ou *Amygdalus communis*) (Kester *et al.*, 1991 e Verma, 2014).

Segundo Verma (2014) a amendoeira, é uma árvore de folha caduca, que pode crescer entre os 4 e os 10 m de altura, onde o tronco pode atingir os 30 cm de diâmetro. Os lançamentos do ano são verdes ao início, ficando arroxeados após a exposição à luz solar, e adquirindo a cor castanha após o seu segundo ano. As folhas são lanceoladas, com 4 a 13 cm de comprimento e 1,2 a 4 cm de largura, as folhas são serradas na margem e têm um pecíolo com cerca de 2,5 cm. As flores são de cor branca ou rosa claras, com 3 a 5 cm de diâmetro e 5 pétalas, produzidas de forma singular ou em pares antes das folhas no início da Primavera. O fruto é uma drupa com 3,5 a 6 cm de comprimento, com uma casca exterior suave. O exocarpo é uma casca endurecida de cor verde acastanhada, que contém lá dentro a amêndoa, geralmente uma e ocasionalmente duas.

2.1.3. Ciclo Não Produtivo

Para que haja uma produção ótima é essencial que as árvores sejam saudáveis e bem implantadas, para tal acontecer, um dos fatores principais é a preparação da zona onde o pomar vai ser instalado de modo a evitar a habitual crise de transplantação que ocorre nas plantas. As novas árvores necessitam de cuidados com a rega, condução e controlo de doenças durante os anos não produtivos, e durante toda a sua vida produtiva (Flint, 2002).

As amendoeiras são classificadas, pela *California Agricultural Statistics Service*

(CASS), como não produtivas até à quarta época de crescimento, ou 3 anos após a plantação, apesar de em alguns pomares a colheita começar na terceira época de crescimento. É durante os anos não produtivos que acontece o período de maior crescimento radicular e que se desenvolvem as estruturas básicas da árvore. Durante o primeiro ano, situações de ‘stress’ causadas por doenças, nemátodes, infestantes ou rega insuficiente, vão comprometer o desenvolvimento radicular e atrasar o crescimento vegetativo. Após os primeiros anos, as árvores tornam-se mais tolerantes a este tipo de ‘stress’ (Flint, 2002).

As árvores passam por dois a três fluxos de crescimento durante o seu primeiro ano no pomar, esses fluxos ocorrem durante a Primavera e o Verão, sendo que o crescimento diminui no final do Verão. Esses fluxos, vão sendo cada vez menores nas épocas de crescimento seguintes (Flint, 2002).

Após a primeira época de crescimento, a árvore é despontada e podada, para seleccionar a estrutura que vai formar a copa, normalmente são seleccionados três ramos para este objetivo. Na segunda época de crescimento os ramos primários são mantidos e a estrutura secundária da árvore é seleccionada, ficando assim formada a estrutura básica da árvore (Flint, 2002).

Se não houver limitações na rega nem em outros fatores de crescimento, os botões florais começam a aparecer em julho, tal como rebentos longos, durante a segunda ou terceira época de crescimento. O desenvolvimento dentro do botão floral começa a acontecer no final do Verão e o Outono. Esses botões florais florescem na época seguinte, e as estruturas de frutificação começam a desenvolver-se a partir dos lançamentos laterais (Flint, 2002).

2.1.4. Ciclo Produtivo

Em novembro, a amendoeira entra em repouso vegetativo, sendo que esse período dura até dezembro. Durante este tempo, a árvore mantém um nível mínimo de transporte de água e de consumo de amido. No Inverno, a desagregação de amido aumenta a concentração de açúcar na seiva, impedindo assim que esta congele. Para produzir amido suficiente para este processo a árvore deve ser suficientemente regada durante o Outono (Flint, 2002).

A floração ocorre entre fevereiro e março e a polinização das flores acontece

quando os grãos de pólen são transferidos das anteras da flor de uma cultivar para o estigma da flor de outra cultivar, e são necessários 50 a 60 grãos de pólen para que a fertilização tenha sucesso. A polinização da amendoeira está maioritariamente dependente de insetos.

Durante abril, a energia de árvore é repartida em dois processos, no crescimento dos ramos e no crescimento do fruto. Em seguida dá-se um rápido período de crescimento das cascas externa e interna, que continua até maio. No final de abril o fruto atinge o tamanho final, nesse momento a camada interna da casca começa a endurecer, enquanto a camada exterior se mantém macia. Este período é crítico, pois se existir algum 'stress' na árvore a camada interna pode rachar ou partir e causar o aborto do embrião levando à perda da amêndoa (Flint, 2002).

O embrião começa a alargar no início de maio, num processo que vai até ao início de junho, e que acaba com a formação da amêndoa. Depois disto, a camada exterior da casca vai começar a rachar e a separar-se da camada interior, o que indica que o fruto está completamente maduro. A camada exterior da casca acaba de endurecer entre junho e julho. Em agosto, e apesar das variações de zona para zona e de ano para ano, começa a colheita, que deve ser iniciada quando 95 a 100% das camadas exteriores da casca se separaram (Flint, 2002).

2.1.5. Condições de Crescimento

Segundo Flint (2002) e Verma (2014) as amendoeiras crescem melhor em solos profundos, bem drenados, não estratificados e com uma textura mais grosseira. Com as condições ideais de solo as raízes podem crescer até 2,7 m de profundidade. As condições físico-químicas do solo que limitem o crescimento das raízes ou afetem a sua sanidade, têm influência direta no tamanho, no vigor e potencial produtivo das árvores. Os solos mais arenosos e argilo-arenosos podem requerer a aplicação mais frequente de azoto e zinco, quer no solo, quer nas folhas.

Quanto às árvores crescem melhor com temperaturas altas, apesar de precisarem de um certo número de horas de frio para a uniformização das flores e para a produção de folhas durante a Primavera. As amendoeiras são suscetíveis às temperaturas extremas, que podem causar queimaduras nas flores e nas amêndoas jovens na Primavera. Para além disso as temperaturas também influenciam a polinização, uma vez que as abelhas não

estão ativas com temperaturas abaixo dos 13°C, com chuvas ou quando a velocidade do vento é superior a 19,3 km/h (Flint, 2002).

2.2. Importância económica e comércio da amêndoa a nível Mundial

A crescente procura pelos frutos secos, onde se inclui a amêndoa, caracteriza-se sobretudo pelos novos estilos de vida e pela crescente procura de uma alimentação saudável. Este aumento vai causar um impacto significativo na melhoria das condições de produção, de colheita, na tecnologia de pós-colheita e embalagem e no *marketing* e logística. Como tal, é de esperar um aumento da produção nos próximos anos, tendo como referência, que a melhoria de rentabilidade da cultura na década passada resultou num aumento da superfície mundial plantada (Valenciano, *et al.*, 2016).

Segundo Valenciano *et al.* (2016), em 2014, a exportação mundial de amêndoa sem casca foi dominada pelos Estados Unidos da América (68,5%), seguido de longe pela Espanha (10,3%) e pela Austrália (6%), na amêndoa com casca os Estados Unidos da América voltaram a apresentar-se com os líderes ao nível da exportação com 62,2%, seguidos pelo Benim (14,7%), Hong Kong (10,9%) e pela Austrália (6,8%) (Quadro 2).

Quadro 2 - Principais países exportadores de amêndoa (sem e com casca) em toneladas

(Fonte: Adaptado de <http://www.cif-businessintelligence.com/>).

Amêndoa sem casca			Amêndoa com casca		
Países	2014	Participação	Países	2014	Participação
EUA	448.367	68,50%	EUA	168.058	62,20%
Espanha	67.254	10,30%	Benim	39.662	14,70%
Austrália	19.535	6,00%	Hong Kong	29.460	10,90%
Alemanha	14.242	2,20%	Austrália	18.275	6,80%
Hong Kong	13.286	2,00%	Gambia	2.339	0,90%
Holanda	13.179	2,00%	Afeganistão	2.284	0,80%
Itália	9.866	1,50%	Espanha	1.513	0,60%
Bélgica	8.040	1,20%	Tunísia	1.432	0,50%
Turquia	6.233	1,00%	Bélgica	1.394	0,50%
Reino Unido	4.429	0,70%	Síria	1.292	0,50%
Chile	3.969	0,60%	Alemanha	751	0,30%
Moçambique	3.112	0,50%	Portugal	710	0,30%
Afeganistão	2.484	0,40%	Itália	465	0,20%
Irão	1.908	0,30%	Líbano	349	0,10%
Benim	890	0,10%	Irão	347	0,10%
Outros	18.020	2,80%	Outros	1.820	0,70%

Nos últimos anos registaram-se poucas alterações na estrutura comercial internacional, aparecendo sempre os Estados Unidos da América como líder mundial e sempre com larga margem, com a Espanha como segundo principal exportador. Do total do comércio mundial, 71% correspondeu a amêndoas sem casca (654.814 ton) e 29% a amêndoas com casca (270.151 ton), sendo que em conjunto ambos os produtos representaram 46% da produção anual. Importa ainda referir que alguns países que se apresentam como exportadores são na realidade *brokers* comerciais, ou seja, importam para exportar, como é o caso da Alemanha, de Hong Kong, da Holanda e da Bélgica (Valenciano, *et al.*, 2016).

Os principais países vinculados com o comércio internacional entre 2010/11 e 2015/16 (Quadro 3), representam 54% do volume mundial de produção e 70% do comércio mundial, segundo os dados da FAOSTAT (*Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division*). Os países que apresentaram um maior crescimento nos últimos anos, no que à produção diz respeito foram os Estados Unidos da América, a Austrália, o Chile e a China. A União Europeia é o principal consumidor de amêndoa, seguida dos Estados Unidos da América, da Índia, da China e dos Emirados

Árabes Unidos (Quadro 4) (Valenciano, *et al.*, 2016).

Quadro 3 - Principais países/regiões produtores de amêndoa entre 2010/11 e 2015/16, em toneladas (Fonte: Adaptado de <http://www.cif-businessintelligence.com/>).

Região/País	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16
EUA	743,891	920,793	857,29	911,72	848,22	816,47
União Europeia	93	83,1	83	58,8	79,7	85
Austrália	37,6	49,6	73,4	65,1	75	82
Turquia	14	16	17	18	13	14
Chile	9	9,1	8,3	3,9	11	12
China	2,5	4	5	7	9,5	10
Índia	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1

Quadro 4 - Principais países/regiões consumidores de amêndoa entre 2010/11 e 2015/16, em toneladas (Fonte: Adaptado de <http://www.cif-businessintelligence.com/>).

Região/País	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16
União Europeia	305,8	300,1	299,3	323,8	308,3	310
EUA	239,156	275,201	302,234	305,624	275,059	290
Índia	54,2	47,1	60,7	53,4	61,5	80,2
China	48,2	96,7	93,1	67,7	57,8	75
Emiratos Árabes Unidos	42,6	55,3	43,6	54,9	61,3	65
Canadá	27,6	28,4	31,2	33,7	35	36
Turquia	27,6	36,6	29,3	33,2	30,8	29
Japão	14,2	20,3	21,3	25,8	25,9	27
Australia	16,3	23,4	24,7	20,8	21	23
Hong Kong	20,3	11,7	12,9	15,2	17,4	19
México	7,9	7,5	10	9,4	11,7	11
Rússia	4,3	5	4,8	5,8	5,2	6
Chile	2,7	3,4	5,1	4,3	4	5
Taiwan	10,8	10,8	0	8,3	5,2	4,5
Malásia	2,8	2,9	2,8	3,5	2,7	3
Argélia	6,6	7,5	6,7	4,3	2,7	2,5

2.3.A cultura da amendoeira no mundo e em Portugal

Na família dos frutos secos, existem diversas culturas que começam a ganhar cada vez mais destaque a nível mundial, devido à sua aptidão para fazerem parte da alimentação moderna, e devido ao facto de serem cada vez mais procuradas pela população mundial, como é o caso da amendoeira (Kester *et al.*, 1991).

Ainda segundo os mesmos autores, a amendoeira é cultivada como semente comestível desde a antiguidade. Foi disseminada a partir do seu centro de origem, a Ásia Central, para todas as civilizações antigas, Ásia, Europa e África do Norte. A amendoeira foi inicialmente introduzida na Califórnia durante o período das missões espanholas nesta região. Entre 1850 a 1900, foi introduzida na região oeste da Austrália, na África do Sul e nas zonas da América do Sul (particularmente o Chile e a Argentina) com climas semelhantes à Califórnia. Durante os anos 60 a região do Mediterrâneo, particularmente Itália, Espanha, França e Portugal foram os principais fornecedores de amêndoa para os países do Norte da Europa e para algumas regiões do Estado Unidos da América.

Abdallah *et al.* (1998) referem o facto da amêndoa ter uma quantidade de ácidos gordos saturados muito baixa, uma quantidade de ácidos gordos monoinsaturados alta e uma quantidade de ácidos gordos polinsaturados alta, o que faz da amêndoa um fruto seco com uma alta concentração de energia, fornecendo uma elevada quantidade de gordura, proteína e fibra. Com este conjunto de propriedades nutricionais, juntamente com a importância económica que lhe é reconhecida fez com que o cultivo de amendoeiras aumentasse nos últimos a nível mundial, tanto na área plantada como nas toneladas produzidas (Figura 1), segundo os dados da FAOSTAT.

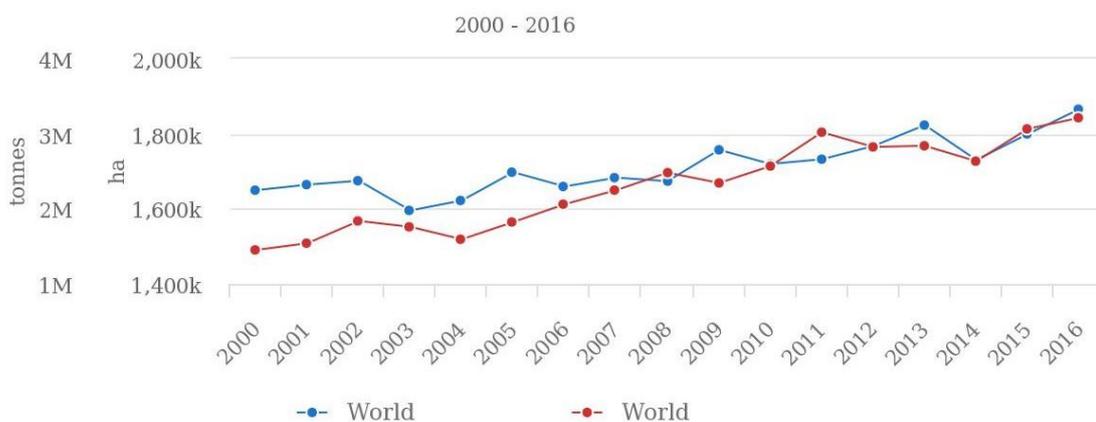
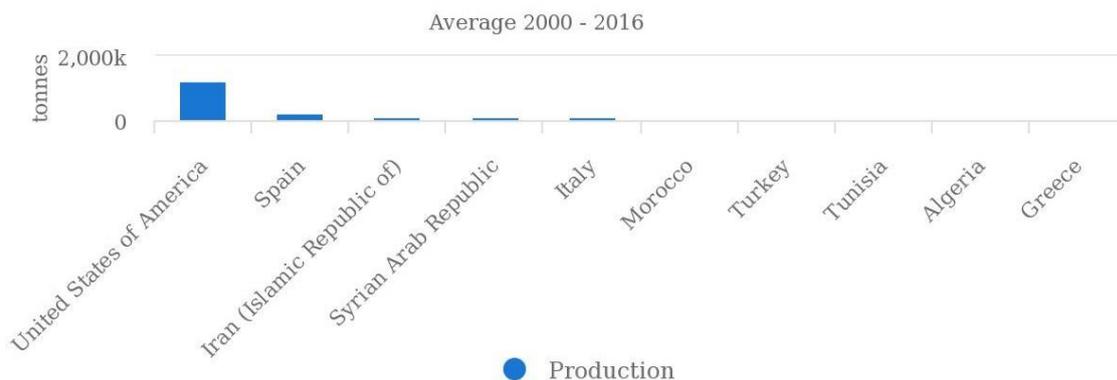


Figura 1 - Produção total da quantidade de amêndoa com casca a nível mundial (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Source: FAOSTAT (jul 18, 2018)

Em grande parte, devido à influência desta cultura na Califórnia, os Estados Unidos da América são o principal país produtor de amêndoas no mundo com uma enorme distância para o resto dos países produtores (Figura 2). Segundo Sumner, *et al.* (2014) na Califórnia a cultura da amêndoa é tão importante que se trata da cultura agrícola mais importante e mais dinâmica, e é uma enorme contribuição para a economia da

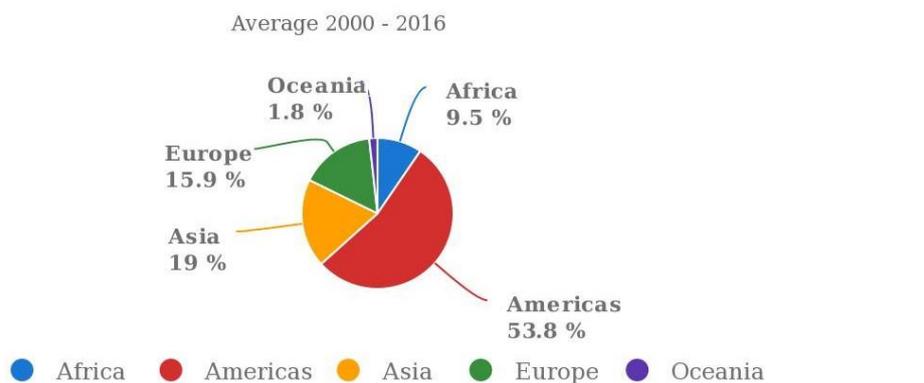
região, sendo responsável por 25% das exportações relacionadas com a agricultura.



Source: FAOSTAT (Jul 18, 2018)

Figura 2 - Top 10 de países na produção de amêndoa com casca (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Em relação à produção a nível continental (Figura 3), a América é o continente com mais de metade da produção mundial, devido à ação dos Estados Unidos da América, na América Central e do Chile e da Argentina na América do Sul, seguida do seu centro de origem, a Ásia, com o Irão e a Síria a apresentarem-se com os principais produtores, e por fim da Europa, que tem como principal produtor a Espanha, seguida da Itália.

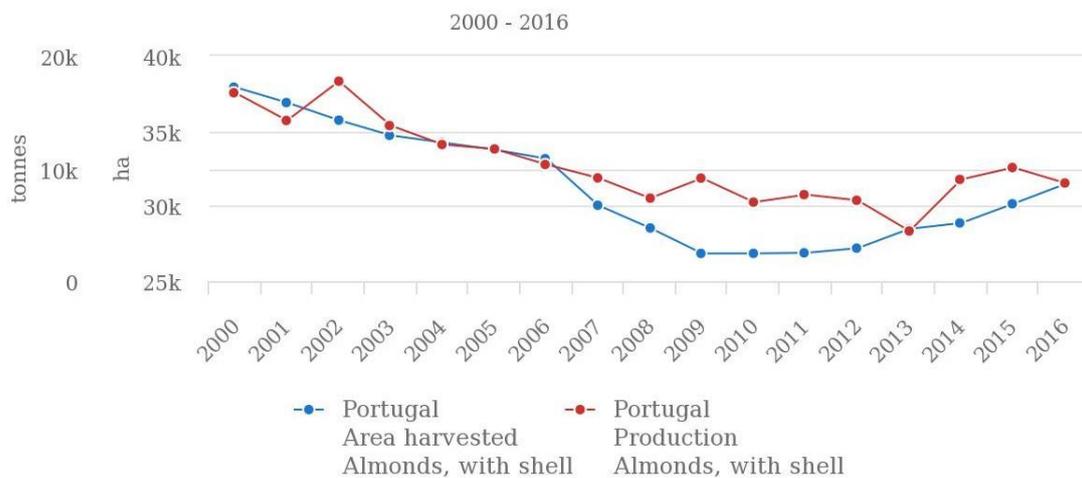


Source: FAOSTAT (Jul 18, 2018)

Figura 3 - Produção de amêndoa com casca por continente (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Segundo os dados da FAOSTAT (Figura 4) e do Instituto Nacional de Estatística – Estatísticas Agrícolas 2016 (Figuras 5 e 6), no caso específico de Portugal, o número de hectares plantados tem vindo a aumentar nos últimos anos, tal como a produção. No ano de 2016 registou-se uma diminuição de 13,6% face ao que havia sido registado no ano anterior, isto deve-se ao facto de nesse ano ter havido um forte ataque de antracnose e das condições ambientais terem sido bastante desfavoráveis. Acresce a estes fatores a condição da maioria dos amendoais, bastante decrépitos e raramente sujeitos a

intervenções culturais. No entanto, é previsível que esta situação venha a ser mitigada a curto prazo com a entrada em produção de muitos pomares modernos instalados nos últimos anos, em particular no Alentejo (Estatísticas Agrícolas, 2016).



Source: FAOSTAT (jul 18, 2018)

Figura 4 - Produção total da quantidade de amêndoa com casca em Portugal (Fonte: FAOSTAT, 2018).

Portugal	Anos	Superfície			Produção		
		2014	2015	2016	2014	2015	2016
		ha			t		
Culturas							
Amêndoa		28 871	30 150	31 464	9 034	10 090	8 713

Figura 5 - Superfície e produção de amêndoa em Portugal (Adaptado de Estatísticas Agrícolas, 2016).

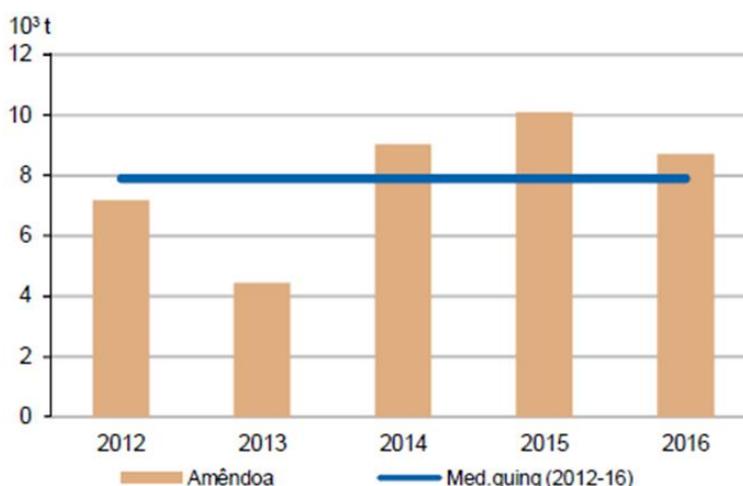


Figura 6 - Produção de amêndoa em Portugal de 2012 a 2016 e média de produção durante o mesmo período (Fonte: INE I.P., Estatística de Produção Vegetal).

Dentro de Portugal em 2016, a região com maior importância e aquela que maior produtividade apresenta é o Norte, seguido pelo Alentejo e pelo Algarve. O Alentejo

apesar de ter menos hectares plantados que o Algarve apresentou melhores produções, isto deveu-se sobretudo ao excelente clima da região para a produção de amêndoa, o que resultou em maiores produções com um menor número de hectares plantados (Figura 7).

NUTS II \ Culturas	Amêndoa	
	Superfície	Produção
	ha	t
Continente	31 464	8 713
Norte	19 873	5 470
Centro	1 184	424
Área Metropolitana de Lisboa	5	4
Alentejo	3 003	2 032
Algarve	7 399	783

Figura 7 - Superfície plantada e produções para amêndoa nas diferentes regiões do país, para o ano de 2016 (Fonte: Adaptado de Estatísticas Agrícolas, 2016).

2.4.Principais doenças das Prunóideas

Segundo Agrios (2005), uma planta está doente quando não é capaz de produzir ao máximo que lhe é permitido pelo seu potencial genético. Na maioria dos casos, esta situação pode ocorrer quando a planta é infetada por um agente biótico ou apresenta um stress abiótico. Assim sendo, e para o primeiro caso, para uma doença biótica ocorrer, é necessário que, planta e agente patogénico, entrem em contacto e interajam e que as condições climáticas adequadas se manifestem. A conjugação destes três fatores originam o Triângulo da doença (Figura 8).

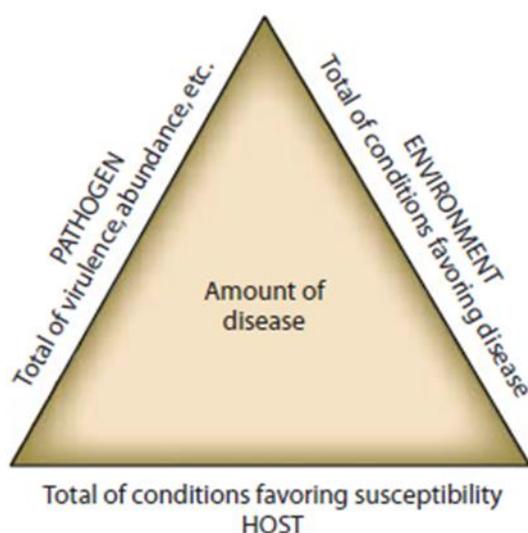


Figura 8 - Triângulo da doença com os três fatores que em conjuntos provocam o aparecimento da doença (Fonte: Agrios, 2005).

2.4.1. As principais doenças da amendoeira

2.4.1.1. CRIVADO

i. Sintomas

Segundo Bubici *et al.*, (2010) as espécies causadoras de crivado aparecem principalmente nas folhas, sendo que por vezes também podem aparecer nos frutos, e com menor expressão nos ramos (no caso do pessegueiro) e nos botões florais dormentes (no caso da amendoeira). Nas folhas, começam por aparecer pontuações vermelhas circulares, com uma margem clorótica ao seu redor, e um diâmetro de 1 a 2 mm. Estas pontuações

vão-se desenvolver em manchas circulares com o centro necrótico e cor-de-laranja acastanhada, com contorno violáceo e 3 mm de diâmetro. Por fim, o centro de necrose destaca-se do resto da folha saudável, dando à folha o aspeto tradicional do crivado (Figura 9A). As folhas infetadas caem das árvores num curto período de tempo. Nos ramos os sintomas começam com o aparecimento de pequenas manchas pretas, que aumentam depois de tamanho, essas manchas tem um centro pálido e afundado e rachas longitudinais na periderme do tronco, das quais saem as gomoses. Manchas semelhantes podem aparecer também nos frutos (Figura 9B) que podem também mumificar, nos botões dormentes e cálices florais.



Figura 9 - Folhas (A) e frutos (B) de prunóideas com sintomas de crivado (A - Fonte: <https://www.flickr.com/photos/hermesalmond/5355220118>; B - Fonte: <https://www.flickr.com/photos/hermesalmond/5354603207>).

ii. Agente causal e ciclo da doença

O crivado é uma doença causada pelo fungo *Stigmina carpophila* (sin. *Wilsonomyces carpophilus*) (Bubici *et al.*, 2010; Yousefi *et al.*, 2014 e Mitre Jr. *et al.*, 2015).

As estruturas do fungo hibernam principalmente nos gomos dormentes e nas lesões dos ramos, no entanto também se podem encontrar nas folhas caídas do ano anterior. Com humidade elevada (chuvas abundantes na Primavera) e temperaturas amenas (acima de 14 - 15°C) os esporos são produzidos abundantemente. A temperatura ótima para o desenvolvimento de micélio é de 19°C. Na presença de humidade elevada, os esporos podem germinar até com temperaturas muito baixas, entre os 2 e os 4°C. Os ramos e gomos podem ser infetados durante o tempo chuvoso, ou em qualquer momento desde o Outono até à Primavera. As infeções nos ramos requerem pelo menos 24 h de

humidade contínua e podem ocorrer com temperaturas baixas. Com o aumento da temperatura no Verão, há uma longa paragem do ciclo da doença, mas os esporos podem sobreviver por vários meses durante o tempo seco. Pomares mal arejados, resultantes de espaço insuficiente entre as árvores ou por poda mal conduzida, são muito mais suscetíveis ao aparecimento da doença (Shaw *et al.*, 1990; Grove 2002 e Bubici *et al.*, 2010).

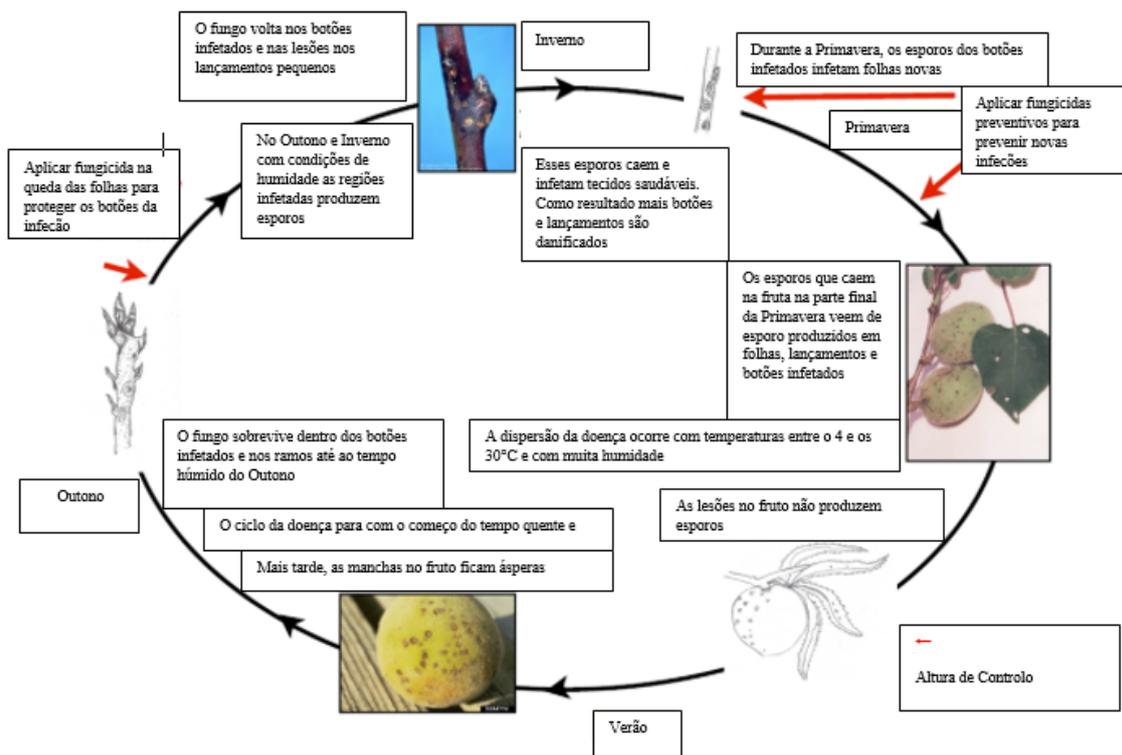


Figura 10 - Ciclo da doença de Crivado causado por *Stigmina carpophila* (Adaptado de <http://mevazor.uz/en/diseases/type/3/item/2/>).

Durante a Primavera, as primeiras chuvas promovem as condições necessárias para ocorrer a infeção primária nas folhas e flores. A infeção em folhas jovens e nos pecíolos pode causar a queda das folhas, enquanto a infeções mais severas podem levar à morte do lançamento terminal. As infeções secundárias podem ocorrer ao longo do crescimento da árvore, como resultado de chuvas adicionais ou da rega por aspersão. Contudo, as infeções dos frutos durante o Verão não resultam na queda do fruto ou na redução do seu tamanho. Durante a época das chuvas, o *S. carpophila* infeta e forma lesões nas folhas. Os conídios resultantes dessas lesões podem passar o Inverno na árvore, em botões saudáveis, e funcionar com inóculo primário para as infeções da Primavera (Figura 10) (Shaw *et al.*, 1990).

iii. Controlo da doença

Segundo Agrios (2005) uma poda sanitária eficaz pode remover os ramos e gomos afetados, mas muitas vezes é impraticável. Manter o pomar bem arejado, por meio de uma poda adequada é uma boa prática cultural. Para além do uso dos fungicidas adequados.

2.4.1.2. MONILIOSE

i. Sintomas

Segundo Agrios (2005) e Cimen *et al.* (2007) os primeiros sintomas aparecem nas flores, e podem aparecer na flor inteira e no pedúnculo. Com o clima húmido os órgãos infetados, ficam cobertos por conídios de cor castanha-acinzentada, sendo que acabam depois por murchar e secar, estes órgãos apodrecidos ficam agarrados à árvore durante algum tempo. Na base das flores infetadas crescem pequenos cancos que se vão desenvolvendo, e acabam por causar por vezes a morte do ramo (Figura 11A). Com a presença de humidade elevada, aparecem também gomoses e tufo de conídios com uma coloração acinzentada na casca das árvores.

Os sintomas nos frutos aparecem quando o fruto começa a atingir a maturação, e revelam-se através de pontuações castanhas e circulares que se espalham rapidamente em todas as direções. Nas áreas infetadas da superfície do fruto começam depois a aparecer aglomerados de conídios cinzentos. Uma grande ou várias pequenas áreas infetadas começam a estar presentes no fruto, que finalmente fica completamente apodrecido e seca (Figura 11B), ficando mumificado no chão ou na árvore (Figura 11C). Por vezes, pequenos cancos também se desenvolvem em ramos ou em ramos com frutos infetados (Agrios, 2005).

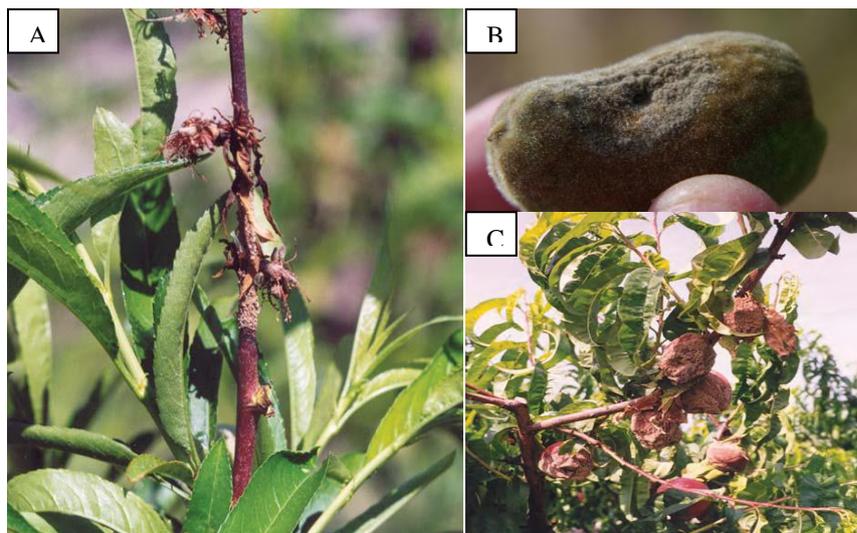


Figura 11 - Botões florais (A), frutos (B) e frutos mumificados (C) afetados por Moniliose (A e C - Fonte: Agrios, 2005; B - Fonte: <https://plantvillage.psu.edu/topics/almond/infos>).

ii. Agente causal e ciclo da doença

As espécies responsáveis pela moniliose são a *Monilinia fructicola*, a *Monilinia laxa* e a *Monilinia fructigena* (Byrde *et al.*, 1977 e Agrios 2005).

Byrde *et al.*, (1977) refere que a amendoeira é um dos principais hospedeiros para as três espécies responsáveis pela moniliose.

O micélio do fungo produz cadeias elípticas de conídios, para além disso produz microconídios, que apesar de não germinarem estão envolvidos na fertilização do fungo (Agrios, 2005).

O agente patogénico passa o período do Inverno em frutos mumificados na árvore e em cancrios presente em regiões afetadas dos ramos, ou em estruturas mumificadas no solo. Na Primavera, o micélio que se encontra presente nos frutos mumificados na árvore e nos cancrios produz novos conídios, enquanto os frutos mumificados no solo produzem apotécios, que irão formar ascósporos. Tanto os conídios como os ascósporos vão iniciar infeções nas flores, a sua disseminação é feita através do ar, de insetos ou da água da chuva (Byrde *et al.*, 1977 e Agrios 2005).

O micélio, especialmente em condições de humidade elevada e com uma temperatura entre os 16°C e os 18°C, produz um elevado número de conídios nas partes afetadas da flor, que são depois libertados. Entretanto, o micélio vai avançando nas pétalas da flor, e pelos ramos onde se começam a formar, com uma cor vermelho-

acastanhada e em forma de escudo, os cancos. Esses cancos vão se desenvolver à volta do ramo, acabando por levar à sua morte. A superfície desses cancos vai ficar rapidamente coberta de conídios, que vão servir de inóculo para a infecção dos frutos quando estes começarem a amadurecer (Agrios, 2005).

Os conídios normalmente entram no fruto através de feridas feitas por insetos, ramos ou pelo granizo, mas em alguns casos entram pelos estomas ou diretamente pela cutícula. Os fungos começam por crescer de forma intercelular e produzem uma enzima que vai causar maceração e vai escurecer os tecidos infetados, para além disto o fungo vai também dar origem à produção de mais conídios no fruto. Em poucos dias o fruto pode ficar completamente infetado e apresentar podridão, ficando pendurado na árvore ou caído no solo. Os frutos que caem no solo são normalmente desintegrados por ação de bactérias ou de fungos saprófitas, já os frutos que ficam nas árvores acabam por secar e mumificar, estes, constituem um dos principais reservatórios da doença (Figura 12) (Byrde *et al.*, 1977 e Agrios 2005).

A infecção dos frutos pode também acontecer após a colheita, em armazenamento ou durante o transporte. Os frutos infetados ficam necrosados após a colheita, e o micélio formado esporula e pode atacar diretamente frutos saudáveis que estejam em contato com os frutos infetados (Agrios, 2005).

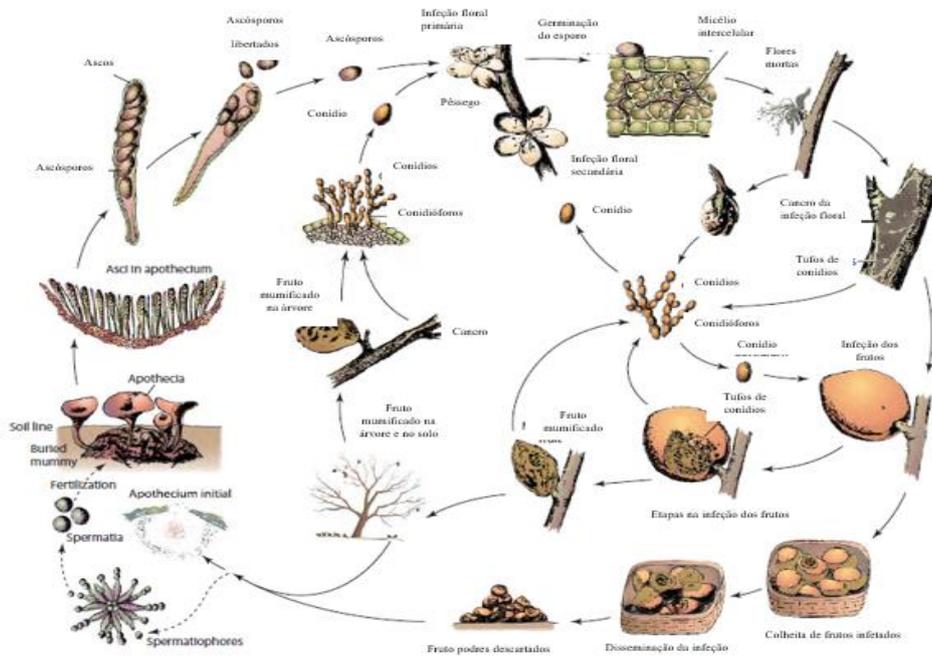


Figura 12 - Ciclo da doença de Moniliose causado por *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* ou *Monilinia fructigena* (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controle da doença

Segundo Agrios (2005) a melhor forma de controlar a moniliose, é na fase de floração, para tal o que se deve fazer é aplicar duas a quatro vezes um fungicida, de preferência cúprico, eficaz desde o momento em que os botões florais ficam cor-de-rosa até à altura da queda das pétalas.

Os ramos que tenham flores infetadas ou cancrios, devem ser removidos o mais cedo possível, de modo a reduzir o inóculo disponível para infeções de frutos ou para reduzir as zonas onde os conídios possam passar o Inverno (Batra, 1991 e Agrios, 2005).

Os fungicidas devem ser aplicados nas árvores umas semanas antes da colheita, e as aplicações devem continuar semanalmente ou de duas em duas semanas até à data da colheita. Uma forma preventiva de controlar a doença passa por controlar os insetos, visto que muitas das infeções que acontecem em frutos maduros e em quase todos os frutos imaturos, são devido às feridas feitas por insetos. Para prevenir infeções na colheita e durante o armazenamento, os frutos devem ser colhidos e manuseados com cuidado, de modo a evitar feridas que possam facilitar a entrada do fungo. Todos os frutos já contaminados devem ser descartados. O aparecimento de moniliose em pós-colheita pode ser reduzida mergulhando o fruto numa solução fungicida após o armazenamento e através do arrefecimento dos frutos, antes da refrigeração a uma temperatura de 0°C a 3°C (Agrios, 2005).

2.4.1.3. LEPRA

i. Sintomas

Segundo Giosuè *et al.*, (2000) e Agrios (2005) as folhas das árvores afetadas ficam distorcidas, engrossam e ficam curvadas para baixo e para dentro (Figura 13 A e B). As folhas afetadas começam por ficar com uma coloração avermelhada ou arroxeadas, mas mais tarde, quando o fungo começa a produzir esporos nas áreas afetadas, estas ficam com uma coloração amarela-avermelhada, seguida de amarela e castanha, e por fim acabam por cair. Apesar de ser com menor frequência, as flores, os frutos jovens e os ramos do ano também podem ser afetados. As flores e os frutos infetados acabam por cair cedo no ciclo de produção, já os ramos começam a atrofiar e acabam por morrer durante o Verão.

A incidência da doença depende da suscetibilidade da espécie, da densidade do inóculo presente no pomar e das condições meteorológicas. (Giosuè *et al.*, 2000).



Figura 13 - Folhas (A e B) e frutos (A) afetados por Lepra (Fonte: <https://www.shutterstock.com/search/taphrina>).

ii. Agente causal e ciclo da doença

A lepra é causada pelo fungo *Taphrina deformans*, e é uma doença que está disseminada por todo o mundo, afetando o potencial de crescimento e a longevidade das árvores, e tendo como principal hospedeiro os pomares de pessegueiros, no entanto afeta também com grande severidade a amendoeira (Giosuè *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2004; Agrios 2005).

Agrios (2005) afirma que as células de micélio do fungo têm dois núcleos, podem transformar-se em ascos, que normalmente contém 8 ascósporos com um núcleo. As estruturas assexuadas do fungo são os conídios.

Mix (1949), Syrop *et al.*, (1976) e Agrios (2005) afirmam que aparentemente o fungo passa o Inverno na árvore, sob a forma de ascósporos ou de conídios com uma parede celular espessa. Na Primavera, esses esporos são disseminados pela água de rega ou por ação do vento para os tecidos mais jovens, onde vão germinar e penetrar, através das cutículas ou dos estomas, nas folhas em desenvolvimento ou noutros órgãos. O micélio que cresce entre as células e invade os tecidos de forma severa, vai causar o alargamento e a divisão das células, que vai provocar o alargamento e distorção dos órgãos da planta. Mais tarde, numerosas hifas crescem entre a cutícula e a epiderme. Nessa zona as células separam-se e cada uma delas produz um asco, esse asco vai alargar e exercer pressão na cutícula do hospedeiro, e eventualmente rompê-la, de modo a criar

uma camada compacta de ascos. Os ascósporos são libertados, e com a ação do vento vão para novos tecidos formando posteriormente os conídios (Figura 14).

As condições ambientais que favorecem a doença na Primavera não são completamente conhecidas, contudo largos períodos de chuva podem favorecer o aparecimento de surtos graves num pomar. O fungo pode começar a crescer um teor de humidade relativa muito alto, cerca de 95%, e com temperaturas baixas, que vão desde o 6°C até aos 26°C, tendo, no entanto, uma temperatura ótima de crescimento entre os 18°C e os 20°C. O risco de aparecimento de lepra aumenta quando as condições ideais se prolongam durante o desenvolvimento dos botões florais. Mais tarde no ciclo as condições climáticas vão-se tornando cada vez menos favoráveis ao aparecimento da doença, as temperaturas altas inibem completamente o aparecimento da doença. A suscetibilidade do hospedeiro é menor com o avançar da idade das folhas, sendo que quando estas se desenvolvem completamente a doença deixa de apresentar um risco económico, embora não seja completamente removida (Giosuè *et al.*, 2000).

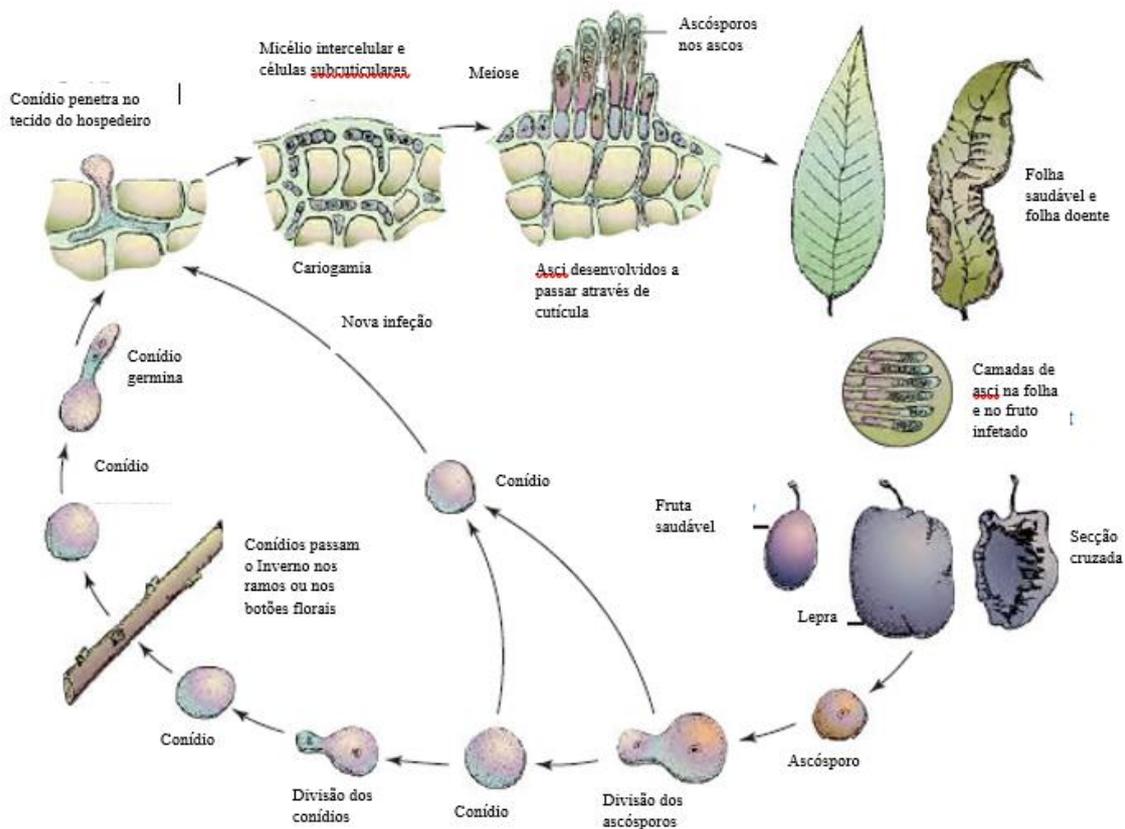


Figura 14 - Ciclo da doença de Lepra causado por *Taphrina deformans* (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controlo da doença

Segundo Giosuè *et al.*, (2000) a lepra é controlada principalmente com recurso à aplicação de fungicidas, no entanto deve também ter -se em conta as adequadas práticas culturais e sanitárias.

A aplicação de fungicidas é feita preferencialmente no final do Outono, depois da queda das folhas ou no início da Primavera antes dos botões foliares incharem (Agrios, 2005).

2.4.1.4. OÍDIO

i. Sintomas

Os sintomas que indicam a presença desta doença começam com o aparecimento de pequenas lesões superficiais, em forma de estrela, evoluindo depois para uma coloração amarela a castanha. A página superior das folhas e a epiderme dos frutos torna-se pulverulenta devido ao crescimento do micélio de cor branca (Figura 15 A e B). Com a evolução da doença, aparecem pontuações pretas, que correspondem às cleistotecas que se podem apresentar isoladamente ou em grupos. Os sintomas descritos apesar de serem mais comuns na página superior das folhas, podem também ser visíveis na página inferior, nos estádios de desenvolvimento mais tardios da doença e em outros órgãos da planta (Agrios, 2005).

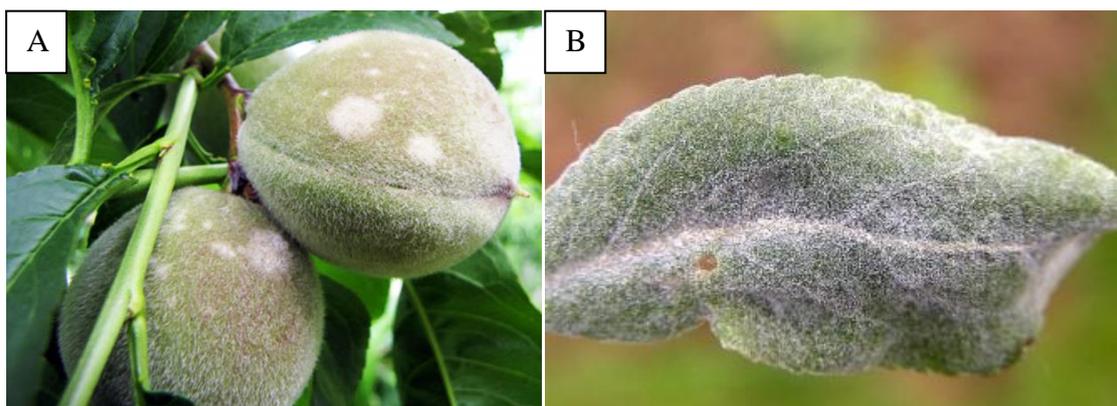


Figura 15 - Frutos (A) e folhas (B) com sintomas de Oídio (Powdery Mildew) (Fonte: <https://agrobasesapp.com/united-states/disease/powdery-mildew-of-almonds>).

ii. Agente causal e ciclo de vida

Penrose (1990) refere que o oídio da amendoeira é causado pelo fungo *Podosphaera tridactyla*, este fungo produz micélio branco que cresce na superfície dos tecidos das plantas, enviando haustórios para as células da epiderme. O micélio vai formar hifas reprodutivas na superfície, algumas das quais se vão desenvolver e formar pequenos conidióforos eretos. Na ponta de cada conidióforo são produzidos 5 a 10 conídios em forma de ovo. Com a chegada das temperaturas mais baixas, a produção de conídios termina e forma-se a estrutura de resistência, a cleistoteca. Esta é constituída por várias hifas resultantes das células do cleistotécio. Os ascósporos, formados dentro de ascos, no interior da cleistoteca, continuam a desenvolver-se durante o Outono, e na Primavera eles estão maduros e prontos para a disseminação. Na Primavera, a cleistoteca absorve água e acaba por rebentar. A ponta de cada asco em cada cleistotécio sobressai, rebenta e liberta 8 ascósporos maduros.

Os tecidos epidérmicos jovens, quando estão na presença de inóculo, ascósporos ou conídios, vão ser infetados pela germinação destes, e as suas células são exploradas pela emissão de haustórios. Através deles o fungo obtém nutrientes da planta enviando-os para os seus constituintes. Cada conidióforo produz cadeias de conídios e estes são transportados pela ação do vento. Quando a temperatura e a humidade relativa estão suficientemente altas, os esporos germinam e infetam novos tecidos, provocando uma infeção secundária. A fotossíntese nas áreas afetadas é muito reduzida e a infeção dos tecidos jovens provoca crescimento irregular das células afetadas e das circundantes, resultando em áreas ligeiramente distorcidas e possivelmente na morte da área afetada se a infeção for severa (Agrios, 2005).

O desenvolvimento da doença é favorecido por uma humidade relativa elevada e por temperatura moderadas, entre os 15°C e os 20°C (Penrose, 1990).

iii. Controlo da doença

O oídio é controlado recorrendo à utilização de produtos à base de enxofre ou através de aplicações de fungicidas de síntese química preventivos ou curativos, sendo que em Portugal ainda não existem produtos homologados para a cultura da amendoeira. Sob a maior parte das condições, uma aplicação semanal é suficiente, mas quando existe um rápido desenvolvimento da doença ou chuvas frequentes podem ser necessárias mais

aplicações. Alguns fungos foram usados experimentalmente como parasitas ou antagonistas do oídio, contudo o controlo biológico ainda não foi desenvolvido o suficiente, apesar de ser promissor (Agrios, 2005).

2.4.1.5. FUSARIOSE

i. Sintomas

O primeiro sintoma a aparecer é uma ligeira descoloração nas nervuras das folhas mais exteriores e jovens. Posteriormente as folhas mais velhas começam a apresentar epinastia causada pela queda dos pecíolos. Contudo, é mais comum nas plantas mais velhas, que apresentam descoloração das nervuras e epinastia nas folhas, estes sintomas são seguidos por um crescimento atrasado das plantas, pelo amarelecimento das folhas, formação ocasional de raízes adventícias, murchidão nas folhas, desfoliação, necrose na margem das folhas restantes, e finalmente a morte da planta. Os frutos também podem ser infetados, mas acabam por cair antes da infeção ser detetada. As raízes são infetadas, após um período inicial de crescimento retardado, as pequenas raízes laterais acabam por apodrecer (Agrios, 2005).

Marek *et al.*, (2013), afirma que o sintoma predominante são necroses na casca interior e no cambio (Figura 16). Os sintomas muitas vezes ocorrem na zona do enxerto, com as áreas necróticas a aparecerem no enxerto, sendo que algumas vezes também aparecem no porta-enxerto. Na ausência de sintomas externos, as necroses internas não são evidentes em muitas árvores, cujo o tronco tenha uma coloração castanha escura,

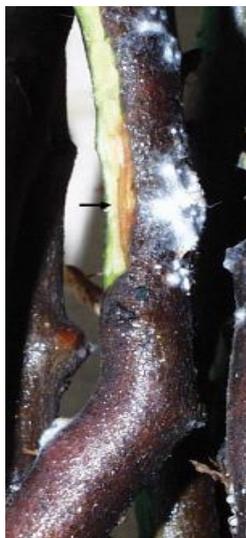


Figura 16 - Aparecimento de esporos em zona com necrose (Fonte: Marek et al., 2013).

contudo essas lesões são mais visíveis em troncos de cor castanha clara ou verde.

ii. Agente causal e ciclo da doença

As espécies de fungos descritas como responsáveis pela fusariose da amendoeira são o *Fusarium avenaceum* e o *Fusarium acuminatum* (Marek *et al.*, 2013). Afifi (1977) refere *Fusarium solani* também como espécie responsável pela fusariose da amendoeira. Agrios (2005) afirma que a maioria das espécies de *Fusarium* podem ser responsáveis pela fusariose e têm um ciclo da doença e desenvolvimento similares.

Quanto a características deste agente patogénico, Agrios (2005) refere que o micélio é incolor ao início, mas com a idade torna-se creme, amarelo pálido, rosa pálido ou arroxeadado, consoante as espécies. O fungo produz três tipos de esporos assexuados, os microconídios, os macroconídios e os clamidósporos. Os microconídios têm uma ou duas células, são os esporos mais frequentemente e abundantemente produzidos em todas as condições, mesmo dentro dos vasos de plantas infetadas. Os macroconídios têm três a cinco células e aparecem em grupos na superfície das plantas mortas pelo agente patogénico. Os clamidósporos têm uma ou duas células, parede espessa e são arredondados, são produzidos dentro ou na parte terminal do micélio mais evoluído ou nos macroconídios. Os três tipos de esporos são produzidos no solo, embora somente os clamidósporos possam sobreviver no solo por muito tempo.

Este fungo sobrevive no solo, mas entre culturas também pode sobreviver em restos de plantas afetadas sob a forma de micélio ou dos três tipos de esporos, mas principalmente sob a forma de clamidósporos. Espalha-se em distâncias curtas através da água e equipamentos contaminados e em distâncias longas através de plantas transplantadas com a infeção e no solo que essas plantas levem com elas. Normalmente, quando uma área fica infetada com *Fusarium* spp., permanece assim durante tempo indeterminado (Agrios, 2005). Quando as plantas saudáveis crescem em solo contaminado, o tubo germinativo dos esporos ou o micélio, vai penetrar diretamente nas extremidades das raízes ou através de feridas nelas existentes. O micélio avança intercelularmente pelo córtex da raiz, atingindo então os vasos do xilema. O micélio fica depois exclusivamente nos vasos e circula através deles, principalmente de baixo para cima e em direção à corola da planta. Nos vasos xilémicos, o micélio vai produzir microconídios, que vão ser separados e levados para cima nos vasos. O micélio também avança lateralmente, em direção aos vasos adjacentes. A combinação destes processos

chama-se entupimento dos vasos, e é responsável pelo ‘stress’ hídrico na planta infetada. Quando a folha transpira mais água do aquela que as raízes e o caule podem repor, os estomas vão fechar e a folha vai murchar e morrer, levando assim à morte do resto da planta. O fungo vai invadir os tecidos da planta morta e esporular, os esporos resultantes vão ser disseminados para novas plantas através do ar ou da água (Figura 17) (Agrios,

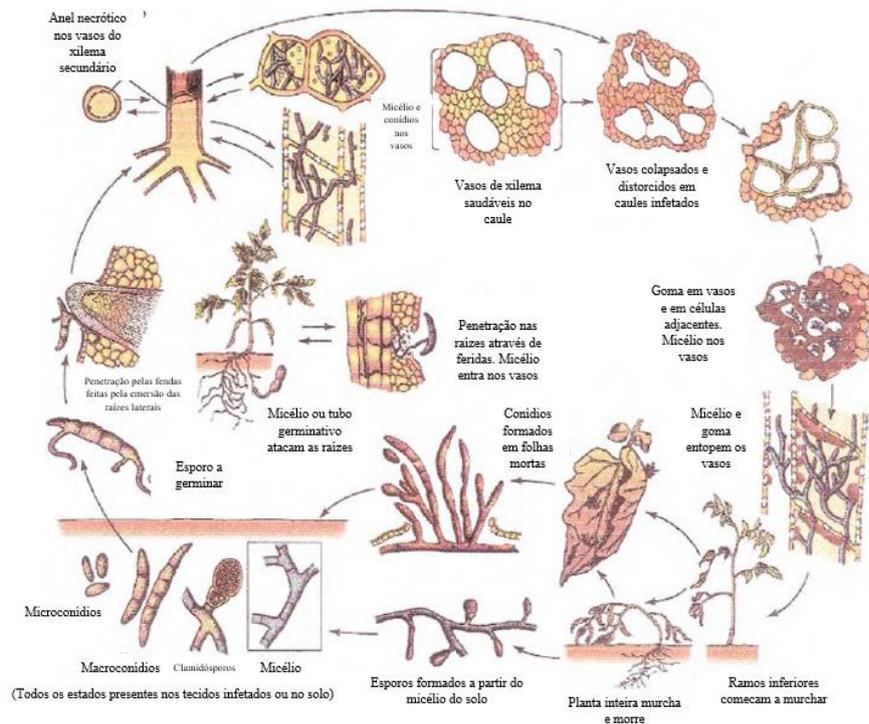


Figura 17 - Ciclo da doença de Fusariose causado por *Fusarium avenaceum*, *Fusarium acuminatum* e *Fusarium solani* (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controlo da doença

Segundo Agrios (2005), a fusariose é uma doença difícil de controlar, sem recorrer a cultivares resistentes ou tolerantes, contudo, existem algumas opções que, embora não sejam totalmente eficazes sozinhas, podem ajudar a diminuir a dispersão da doença, tais como; a utilização de plântulas e sementes livres de doenças; plantas com resistência genética; solarização do solo; realização de mobilizações no solo; rotação com culturas não-suscetíveis; boa drenagem no solo; fertilização azotada correta.

2.4.1.6. DOENÇAS DO LENHO

i. Sintomas

Os fungos do lenho estão distribuídos mundialmente, e afetam uma ampla gama de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas e gimnospérmicas (Gure et al., 2005).

Segundo Sessa et al. 2016 as doenças do lenho podem apresentar sintomas severos em prunóideas, as árvores afetadas apresentam sintomas como cancrios nos ramos, galhos e no tronco principal, cancro na raiz, declínio e em alguns casos a morte completa da árvore. Pode afetar os troncos, os ramos e também os frutos. O córtex externo do cancro fica cor-de-laranja ou castanho e apresenta uma textura papirácea.

Os sintomas da doença estão associados com lenticelas, e incluem lesões necróticas na casca da árvore e formação de goma no tronco e nos limbos. As gomoses ocorrem frequentemente em pessegueiros, damasqueiros, ameixeiras, cerejeiras e amendoeiras, e reduzem o crescimento e a produtividade da árvore, especialmente em cultivares suscetíveis (Wang et al., 2011). A doença é caracterizada por depósitos de gomas que foi exsudada pela casca dos troncos, limbos e ramos (Weaver, 1974) (Figura 18). Outros sintomas que se verificam incluem lesões necróticas profundas (1 a 2 centímetros de diâmetro) na casca em volta das lenticelas e gomoses nas lenticelas doentes. Em ramos jovens as lenticelas infetadas tornam-se inchadas, mas a gomose geralmente não acontece (Weaver, 1979).



Figura 18 - Sintomas de doenças do lenho em amendoeiras (Fonte: <https://flotrouillas.faculty.ucdavis.edu/research-projects/>).

ii. Agentes Causais e Ciclo da Doença

Dois dos fungos responsáveis pelas doenças do lenho no amendoal são *Botryosphaeria* spp. e *Cylindrocarpon* spp. (Agris, 2005).

A *Botryosphaeria* produz conídios em picnídios e ascósporos nas peritecas, nos cancos, nos frutos mumificados e na casca da madeira morta. O fungo passa o Inverno sob a forma de micélio, ascósporos e conídios na árvore. Na Primavera e durante a época de crescimento, os conídios e os ascósporos são libertados durante as chuvas, sendo depois levados para as folhas, para os frutos e para a madeira onde iniciam novas infeções (Agrios, 2005).

O *Cylindrocarpon* por vezes produz microconídios unicelulares, e de forma mais comum macroconídios cilíndricos com duas a quatro células. Os microconídios tem uma cor branca, amarelada ou laranja e são produzidos na epiderme das zonas infectadas (Agrios, 2005).

Segundo Agrios (2005) os conídios são produzidos durante o Verão e no início do Outono. A sua disseminação é feita através da chuva, do vento, dos insetos e do material de poda. As peritecas aparecem no final do Verão e no Outono nos cancos formados pela doença.

iii. Controlo

Agrios (2005), diz que a melhor maneira de efetuar o controlo das doenças do lenho passa por remover as zonas infetadas através da poda e queimar todas as zonas removidas e aplicar os fungicidas apropriados na árvore.

2.5.Fungos Endofíticos

A simbiose pode ser definida como uma associação a longo prazo entre dois organismos de espécies diferentes, seja essa relação benéfica para ambos os indivíduos envolvidos ou não. A maioria dos organismos vivos tem relações simbióticas com microrganismos, sendo um exemplo destas relações o que acontece entre fungos endofíticos e plantas (Rodriguez *et al.*, 2008).

Os fungos endofíticos são microrganismos que residem, durante todo, ou pelo menos um período do seu ciclo de vida no interior de uma planta hospedeira e que têm a capacidade de ocupar e colonizar os tecidos saudáveis e órgãos destas, e desenvolvem-se tanto inter com intracelularmente, sem causar nenhum sintoma negativo visível, estabelecendo assim uma interação simbiótica com a planta. Este fenómeno acontece praticamente em todas as plantas estudadas até então. Os endofíticos habitam, de um

modo geral, as partes aéreas das plantas, como folhas e caules (Rodriguez *et al.*, 2008; Pimenta *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013 e Torres *et al.*, 2015).

Os endofíticos podem ser transmitidos de geração em geração, verticalmente, do parente para a descendência, ou horizontalmente, de um indivíduo para ou outro indivíduo não relacionado. Os fungos endofíticos transmitidos verticalmente são assexuados, e transmitidos através de uma hifa que penetra nas sementes do hospedeiro. Como a sua reprodução está ligada com o hospedeiro, estes endofíticos são muitas vezes mutualistas. Por outro lado, se forem transmitidos horizontalmente, os fungos endofíticos são sexuados e transmitidos via esporos, que são disseminados pelo ar ou por insetos vetores. (Selosse *et al.*, 2004).

Apesar de na maior parte das vezes a relação simbiótica entre o fungo endofítico e a planta ser mutualista, esta relação pode por vezes tornar-se parasita, originando assim doença na planta. Esta interação flexível é determinada pelas necessidades nutricionais do endófito, pela envolvente ambiental, bem como por pequenas diferenças na expressão genética do fungo. Quando o equilíbrio estabelecido na interação for perturbado, os fungos endofíticos podem tornar-se fungos patogénicos e provocar sintomas de doença na planta ou levar à exclusão do fungo pelos mecanismos de defesa da planta (Figura 19) (Schulz *et al.*, 2006).

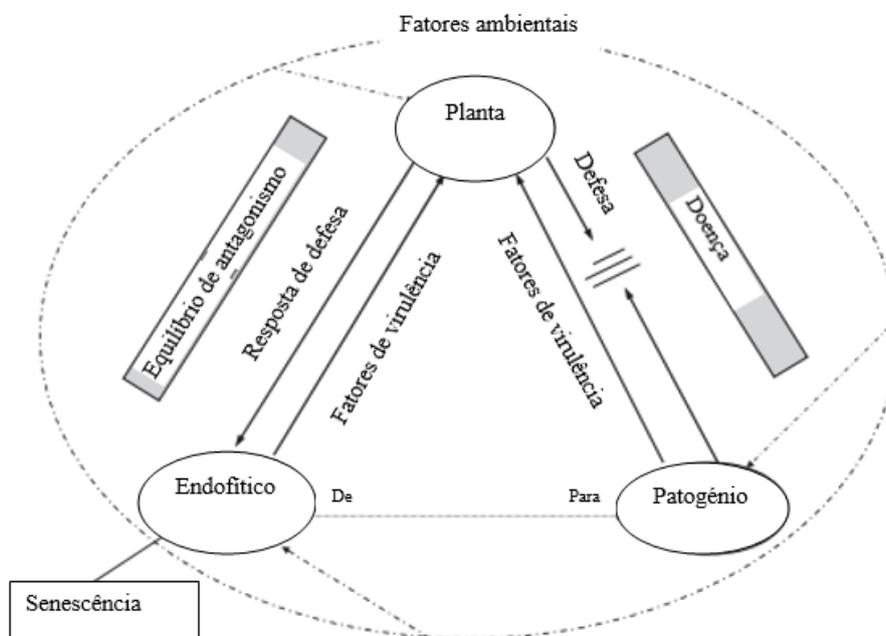


Figura 19 - Hipótese explicativa para o estabelecimento de relações mutualismo ou parasitismo entre um fungo endofítico e uma planta hospedeira (Adaptado de Schulz et

Os fungos endofíticos podem existir em tecido vegetais saudáveis ou doentes, destacando assim a incerteza entre os limites que separam os fungos endofíticos, dos agentes patogênicos facultativos, e dos agentes patogênicos latentes. Os fungos patogênicos capazes de não deixar sintomas de ocupação nos seus hospedeiros, em parte do seu ciclo podem ser considerados endofíticos (Scharndl *et al.*, 1993).

Neda *et al.*, 2011 afirma que a associação planta-endofítico tem uma natureza dinâmica, na qual muitos fatores afetam a estrutura e a composição das espécies das comunidades microbianas que colonizam as raízes, ramos e folhas. A diversidade de endofíticos depende de fatores ambientais e da interação com outros endofíticos ou com organismos patogênicos.

Uma das características dos fungos descritos como endofíticos é a de exibirem um largo e imperceptível período no qual o crescimento e a colonização cessam temporariamente, retomando a sua atividade depois uma alteração física ou de maturação no hospedeiro (Stepniewska *et al.*, 2013 e Zuccaro *et al.*, 2014). Este crescimento episódico distingue os fungos endofíticos dos restantes, quer sejam considerados saprófitas comensais, patogênicos latentes ou mutualistas protetores (Saikkonen *et al.*, 2004).

Neda *et al.* 2011, Patel *et al.* 2013 e Torres *et al.* 2015 afirmam que os fungos endofíticos foram inicialmente descritos como assintomáticos e muitos dos endofíticos isolados até ao momento não têm qualquer efeito nos hospedeiros, são muitos os que já demonstraram ter uma função concreta na planta, como aumento da tolerância a agentes patogênicos, herbívoros, pragas, aumento do crescimento e a produção de biomassa, ajudam na reprodução e podem ser um auxílio importante ao ‘stress’ provocado por fatores abióticos. Estes agentes endofíticos podem ainda produzir toxinas, antibióticos ou outros fármacos, fatores de crescimento e muitos outros produtos de interesse farmacêutico (Pimenta *et al.*, 2012 e Lu *et al.*, 2012).

O potencial dos microrganismos endofíticos como fonte de metabolitos bioativos com possíveis aplicações na medicina e na agricultura tem suscitado muito interesse e originado muitos estudos sobre estes organismos e sobre o seu uso, no controlo biológico das doenças das plantas como alternativa aos pesticidas químicos (Aly *et al.*, 2011).

Na prunoídeas também existem estudos que provam que os fungos endofíticos podem ter influência na árvore. Pimenta *et al.* (2012) descobriu que o fungo endofítico

Phaeosphaeria nodorum, produzia componentes voláteis que desempenham um papel significativo na redução da expansão de *Monilinia fructicola* nos tecidos de ameixa. Também Neda *et al.* (2011) afirma que, no caso da cereja existem fungos endofíticos que são omnípotentes e que provavelmente aumentam a aptidão da planta, ao melhorarem a sua tolerância a metais pesados e à seca, reduzirem o ataque de herbívoros e de agentes fitopatogênicos e promovem o seu crescimento.

3. Materiais e Métodos

3.1. Apresentação e caracterização das parcelas em estudo

O estudo dos problemas fitossanitários da amendoeira em modo de exploração super-intensivo realizou-se em dois distritos diferentes de Portugal, um no Distrito de Portalegre e outro no Distrito de Évora, sendo que ambas as parcelas pertencem à região do Alentejo. Nas duas parcelas em estudo a cultura do amendoal foi instalada em abril de 2016. As cultivares escolhidas foram a *Lauranne Avijor* e a *Soleta*, ambas são cultivares europeias, tendo a primeira origem francesa e a segunda origem espanhola. O porta-enxerto utilizado em ambos os sítios foi o RP-20. Foram escolhidas estas cultivares por estarem presentes nos dois locais em estudo e por serem as cultivares mais utilizadas em Portugal em modo super-intensivo.

3.1.1. Localização dos locais de amostragem

O local A situa-se no Concelho de Monforte, no distrito de Portalegre (Figura 20) e a área de amendoal usada para estudo foi 21,836 ha.



Figura 20 – Parcela em estudo no local A.

O local B fica situado na freguesia de Torre de Coelheiros, no distrito de Évora (Figura 21) e a área de amendoal usada neste estudo foi de 25,967 ha.



Figura 21 - Parcela em estudo no local B.

3.1.2. Condições edafo-climáticas de Portalegre e de Évora

3.1.2.1. Clima

Os dados climáticos apresentados para o distrito de Portalegre (Quadro 5) e para o distrito de Évora (Quadro 6) foram retirados dos dados publicados pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera, para uma normal climatológica de 30 anos (1971 a 2000).

Quadro 5 - Dados relativos à temperatura do ar e à precipitação na estação meteorológica de Portalegre entre os anos de 1971 e 2000 (Fonte: Instituto Português do Mar e da Atmosfera).

Informação sobre a Estação Meteorológica de Portalegre entre 1971 e 2000							
Mês	Temperatura mensal do ar (°C)					Precipitação mensal (mm)	
	Média	Média Máxima	Média Mínima	Valor máximo	Valor mínimo	Média quantidade total	Quantidade máxima diária
Janeiro	8,5	11,4	5,7	20,4	-4,5	109,6	61,2
Fevereiro	9,4	12,6	6,2	22,5	-3,7	95,5	63,9
Março	11,5	15,4	7,6	25,5	-2,8	63,3	47,9
Abril	12,3	16,5	8,2	29,6	-0,2	78,4	52,3
Mai	15,3	20,0	10,6	32,3	2,1	67,5	48,0
Junho	19,9	25,4	14,4	39,4	5,0	31,6	40,8
Julho	23,5	29,8	17,3	40,4	8,2	7,5	28,7
Agosto	23,5	29,7	17,2	39,1	8,6	8,5	20,5
Setembro	21,2	26,2	16,1	39,5	6,0	42,1	54,3
Outubro	16,2	19,9	12,5	31,0	3,5	97,5	75,5
Novembro	12,1	15,0	9,1	25,7	1,0	114,9	66,6
Dezembro	9,5	12,2	6,8	23,2	-1,1	136,0	67,5

As temperaturas registadas pela estação meteorológica de Portalegre (Quadro 5) mostram que, durante os 30 anos da normal climatológica, os valores de temperatura média mensal estiveram compreendidos entre os 8,5°C e os 23,5°C, sendo o mês mais frio janeiro e os meses mais quentes julho e agosto.

Os valores médios de temperatura foram de 29,8°C em julho (máximos) e de 5,7°C em janeiro (mínimos). A temperatura máxima registada foi durante o mês de julho com 40,4°C e a temperatura mínima foi observada durante o mês de janeiro com -4,5°C.

No que diz respeito à precipitação, o mês com maior valor foi o mês de janeiro e aquele que registou um menor valor foi julho, com 109,6 mm e 7,5 mm, respetivamente. Em relação ao valor de precipitação máxima diária, o mais elevado foi no mês de outubro

com 75,5 mm e os valores mínimos de precipitação diários registaram-se no mês de agosto com 20,4 mm.

Ao agrupar a temperatura e a precipitação num só gráfico obteve-se o gráfico termopluiométrico para o distrito de Portalegre (Figura 22).

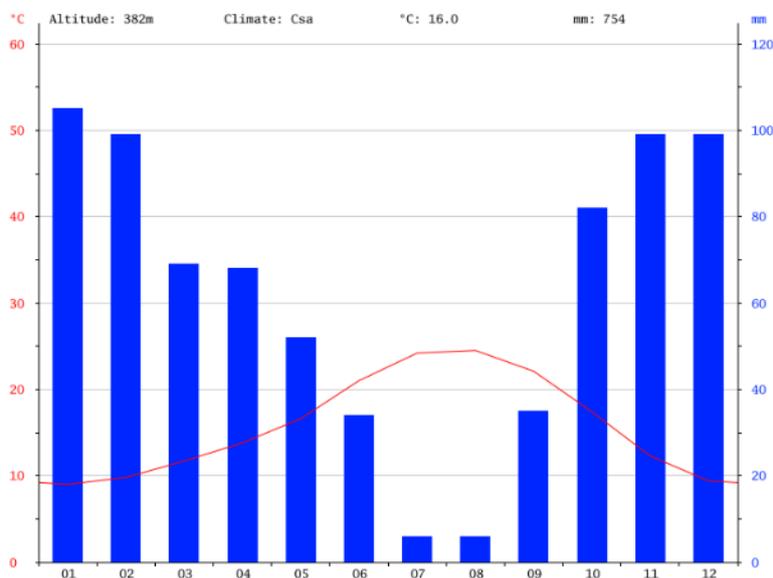


Figura 22 - Gráfico termopluiométrico de Portalegre
(Fonte: <https://pt.climate-data.org/location>)

Quadro 6 - Dados relativos à temperatura do ar e à precipitação na estação meteorológica de Évora entre os anos de 1971 e 2000 (Fonte: Instituto Português do Mar e da Atmosfera).

Informação sobre a Estação Meteorológica de Évora entre 1971 e 2000							
Mês	Temperatura mensal do ar (°C)					Precipitação mensal (mm)	
	Média	Média Máxima	Média Mínima	Valor máximo	Valor mínimo	Média quantidade total	Quantidade máxima diária
Janeiro	9,3	12,8	5,8	21,0	-2,9	78,5	62,7
Fevereiro	10,4	14,0	6,7	24,2	-1,4	67,0	46,2
Março	12,4	16,8	8,0	27,4	-1,8	41,9	36,0
Abril	13,5	18,0	9,0	30,5	2,0	58,1	47,3
Mai	16,2	21,2	11,1	34,2	4,9	49,9	51,5
Junho	20,2	26,3	14,0	41,0	6,7	20,4	37,2
Julho	23,2	30,2	16,3	42,0	9,8	8,6	69,8
Agosto	23,2	30,2	16,5	39,6	11,0	6,6	48,9
Setembro	21,4	27,2	15,6	39,7	7,6	29,8	55,3
Outubro	17,0	21,5	12,6	32,4	4,0	69,8	56,0
Novembro	13,0	16,7	9,3	26,6	1,4	76,1	53,2
Dezembro	10,4	13,6	7,2	21,5	-1,5	102,7	67,2

No caso do distrito de Évora (Quadro 6), pode-se observar que o mês com a média mais alta e os meses com a média mais baixa foram julho/agosto e janeiro com 23,2°C e 9,3°C, respetivamente.

Os valores médios de temperatura foram de 23,2°C em julho (máximos) e de 5,8°C. em janeiro (mínimos). A maior temperatura registada foi durante o mês de julho com 42°C e a menor temperatura foi observada durante o mês de janeiro com -2,9°C.

Relativamente à precipitação, o mês com a maior média foi dezembro e o mês com a menor média foi agosto, com valor de 102,7 mm e 6,6 mm, respetivamente. O mês que registou a maior precipitação diária foi julho com 69,8 mm, em ponto oposto, o mês em que se registou a menor precipitação foi março com 36,0 mm.

Ao agrupar a temperatura e a precipitação num só gráfico vai-se obter o gráfico termopluiométrico para o distrito de Évora (Figura 23).

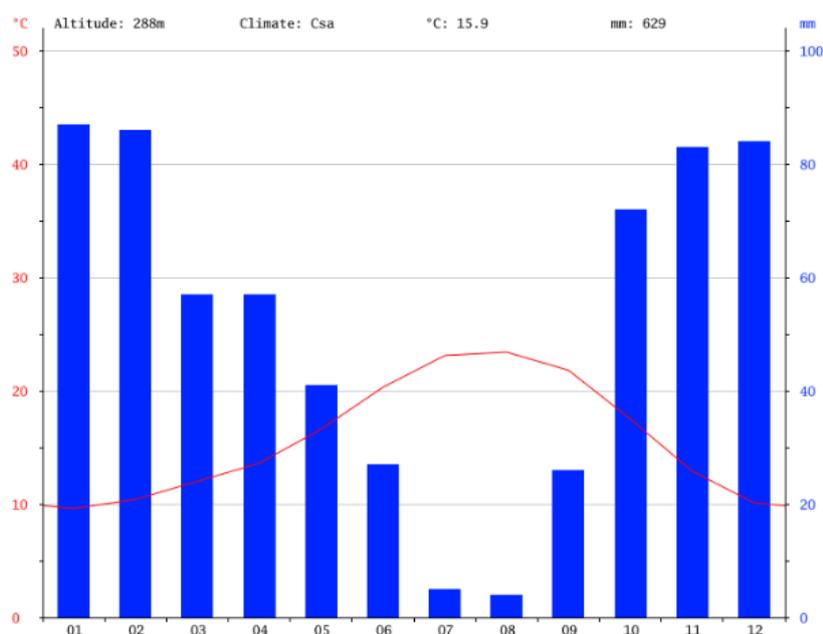


Figura 23 - Gráfico termopluiométrico de Évora (Fonte: <https://pt.climate-data.org/location/135/>).

3.1.2.2. Solos

Para a identificação e caracterização dos solos presentes em cada uma das parcelas utilizaram-se as cartas de solos associadas às zonas onde estas estão localizadas. As cartas de solo foram tratadas com recurso ao programa *ArcGis* (ESRI 2011) (Anexo I e Anexo II).

I. Local A

Para identificar os solos presentes na parcela situada no local A utilizou-se o programa *ArcGis* (ESRI 2011) em conjunto com a Carta de Solos de Portugal nº 32 – D com uma escala de 1:25000 (Anexo I). Os solos encontrados foram o Pmn (d.p.) e o Bp. Segundo a DGADR (Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural), o solo Pmn pertence à família dos Solos Argiluiados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Normais, de rochas cristalofílicas. A descrição do perfil a que corresponde este solo é a seguinte:

Solos Argiluiados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Normais, de rochas cristalofílicas

Horizonte A1 – 15 a 30 cm; pardo-amarelado-escuro ou pardo-acinzentado-escuro; franco-arenoso ou areno-franco, por vezes franco, normalmente com saibro e cascalho subangulosos de quartzo; estrutura granulosa média ou grosseira fraca; muito friável ou solta.

Transição nítida para

Horizonte B1 – 10 a 15 cm; pardo ou pardo-amarelado-escuro; franco ou franco-argilo-arenoso, normalmente com saibro e cascalho subangulosos de quartzo; estrutura anisoforme grosseira e média, moderada a fraca; friável.

Transição nítida para

Horizonte B2 – 15 a 30 cm; pardo-oliváceo, por vezes com algumas ou bastantes manchas pardo-amareladas e pardo-acinzentadas escuras; franco-argiloso a argiloso, por vezes franco-argilo-arenoso, normalmente com saibro e cascalho subangulosos de quartzo e de rocha-mãe; estrutura anisoforme angulosa muito grosseira forte, por vezes tendente para prismática média moderada; com agregados de películas de argilas; firme; com algumas concreções ferruginosas.

Transição gradual para

Horizonte C – Material proveniente da meteorização de rochas cristalofílicas, nomeadamente xistos e gneisses.

O outro solo existente no local A é o Bp. Cardoso (1965), diz que o solo Bp esta inserido na família dos Barros Pretos Não Calcários de dioritos ou gabros. Segue-se a descrição do perfil correspondente ao solo Bp.

Barros Preto Não Calcários de dioritos ou gabros

Horizonte Ap – 20 a 40 cm; pardo-acinzentado muito escuro ou castanho (tonalidades compreendidas entre 10 YR e 7,5 YR); argiloso, por vezes franco-argiloso; estrutura anisoforme angulosa média a grosseira forte composta de granulosa média moderada; firme e rijo ou extremamente rijo; fendilha quando seca; efervescência nula ou CIH; pH 6,5 a 7,5.

Transição nítida para

Horizonte B – 10 a 60 cm; idêntico ao anterior mas de estrutura prismática média ou grosseira forte apresentando películas de argilas nas faces dos agregados; com superfícies polidas («slickensides»); pH 6,5 a 8,0.

Transição gradual para

Horizonte BC – 10 a 15 cm; mistura de material idêntico ao das camadas anteriores com saibro ou fragmentos prismáticos provenientes da desagregação da rocha-mãe; pH 6,5 a 7,5.

Transição gradual para

Horizonte C – Material originário: saibro e/ou fragmentos prismáticos provenientes da meteorização de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas.

II. Local B

Tal como para o local A, também para o local B recorreu-se ao programa *ArcGis* juntamente com a Carta de Solos de Portugal nº 40 – A com uma escala de 1:25000 (Anexo II) para identificar os solos presentes nesta parcela. Os solos encontrados foram o Pmg, o Ca, o Pmg + Pmg (p) e o Pgm + Pgm (d). Numa das misturas de solos presentes no solo da parcela, um dos Pmg encontra-se em fase pedregosa, o que pode indicar que o solo poderá ter precisado de algumas operações de desprega. Na outra mistura de solos, um dos Pgm esta em fase delgada, o que indica um solo com uma profundidade baixa no total dos seus horizontes.

Segundo Cardoso (1965) Pgm refere que o este solo pertence à família dos Solos Argiluvitados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Normais, de quartzodioritos.

Solos Argiluiados Pouco Insaturados - Solos Mediterrâneos, Pardos, de Materiais Não Calcários, Normais, de quartzodioritos

Horizonte A1 – 15 a 35 cm; pardo ou castanho; franco-arenoso a arenoso; estrutura granulosa fina fraca ou sem agregados; não aderente, não plástico, muito friável ou solto, fofo ou solto; pH 5,5 a 6,5.

Transição nítida ou abrupta para

Horizonte B – 20 a 50 cm; pardo ou castanho com pontuações esbranquiçadas de feldspatos; franco-argilo-arenoso, franco-argiloso, argilo-arenoso ou argiloso; estrutura prismática média ou grosseira moderada ou fraca; há películas de argila nas faces dos agregados; aderente, plástico, muito firme ou firme, muito rijo ou rijo; pH 6,5 a 7,5.

Transição nítida ou gradual para

Horizonte C – Material originário proveniente da desagregação de quartzodioritos, notando-se nele, além de feldspatos, partículas de quartzo e de micas.

Na parcela esta presente também o solo Ca, que segundo Cardoso (1965), são Solos Hidromórficos, Sem Horizonte Eluvial, Para-Aluviossolos, de aluviões ou coluviais de textura mediana. Em seguida apresenta-se a sua descrição.

Solos Hidromórficos, Sem Horizonte Eluvial, Para-Aluviossolos, de aluviões ou coluviais de textura mediana

Horizonte A1 – 20 a 30 cm; pardo-acinzentado, pardo-acinzentado-escuro ou cinzento-escuro; textura mediana; com estrutura granulosa média e fina moderada; aderente ou pouco aderente, plástico ou pouco plástico; friável, pouco rijo; pH 6,0 a 8,0.

Transição abrupta ou nítida para

Horizonte Bg – 30 a 90 cm; cinzento muito escuro ou preto; franco-argiloso, por vezes argiloso; com estrutura prismática ou anisoforme angulosa média moderada; aderente, plástico, friável ou firme, rijo ou muito rijo; pH 5,5 a 6,5.

Transição gradual para

Horizonte Cg – Material originário de origem aluvionar ou coluvionar de constituição algo variável mas em geral de cor menos escura, de textura mais ligeira e de menor grau de estrutura que o horizonte superior.

Por fim, o último solo presente na parcela é o Pgm, Cardoso (1965) afirma que

este solo pertence à família dos Solos Litólicos, Não Húmicos, Normais, de rochas eruptivas de composição mineralógica entre o granito e o quartzodiorito.

Solos Litólicos, Não Húmicos, Normais, de rochas eruptivas de composição mineralógica entre o granito e o quartzodiorito

Horizonte Ap – 15 a 25 cm; pardo ou pardo-amarelado; arenoso; sem agregados; solto; pH 5,5 a 6,5.

Transição gradual para

Horizonte B – 15 a 20 cm; pardo ou pardo-amarelado; franco-arenoso ou franco; estrutura anisoforme subangulosa grosseira fraca; pH 6,0 a 7,0.

Transição gradual para

Horizonte C – Material originário proveniente da desagregação de rochas eruptivas de composição mineralógica entre granito e quartzodiorito, principalmente quartzomonzoritos e granodioritos, o qual é de textura mais fina do que o dos solos (Pg).

3.1.3. Sistemas de rega nos locais utilizados nos locais A e B

Em ambos locais o sistema de rega utilizado é a rega localizada, mais precisamente a rega gota-a-gota (Figuras 24 e 25).

CLASSIFICAÇÃO PORTUGUESA DOS SISTEMAS DE REGA			
MÉTODOS	PROCESSOS		
Escorrimento	Regadeiras de nível		Rega por gravidade
	Regadeiras inclinadas		
	Planos inclinados		
	Cavaletes		
	Faixas		
Submersão	Canteiros		Rega à pressão
	Caldeiras		
Infiltração	Sulcos		
	Rega subterrânea		
	Rega Localizada	Gota-a-gota	
		Miniaspersão	
Rega por aspersão			

Figura 24 - Classificação Portuguesa dos Sistema de Rega (Fonte: Raposo, 1997).

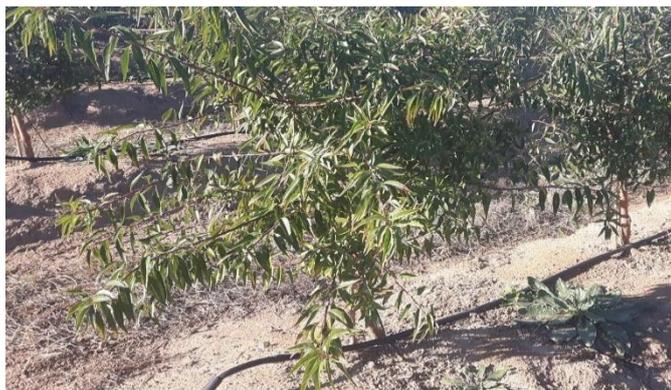


Figura 25 - Exemplo de rega gota-a-gota com uma fita de emissores no local B

Segundo Oliveira (2011), a rega localizada, tem por objetivo aplicar água numa fração da superfície ocupada pelo próprio sistema de rega, ou seja, humedecer apenas uma área parcial. Dentro da classificação de rega localizada encontra-se a rega gota-a-gota, assim chamada por se tratar de um método que aplica água de uma forma lenta e pontual, localizada sob a forma de gotas, em locais previamente fixados e por intermédio de emissores (gotejadores), uniformemente distribuídos ao longo dos ramais laterais.

O mesmo autor refere que água é aplicada ao solo por intermédio de emissores funcionando a baixa pressão, da ordem dos 20 a 200 kPa, e dimensionados para pequenos caudais, entre 2 a 12 L/h. Os emissores podem estar inseridos diretamente nas laterais dos ramais, ou em pequenos ramais derivados deste, e estão colocados sobre a superfície do solo, ou suspenso a uma pequena altura do solo.

A água que sai do emissor vai ser distribuída no solo à volta deste, de acordo com um determinado padrão de humedecimento, que depende das características hidráulicas do solo em questão. Assim, se o afastamento entre os emissores for grande a zona humedecida é apenas pontual, mas se esse afastamento for menor, a zona humedecida pode tomar a forma do ramal lateral onde está o emissor. Nestas condições, conhecer a profundidade do solo e a distribuição das raízes ajudarão a definir qual o espaçamento entre emissores, ou no caso de pomares, a necessidade de um maior número de emissores por árvores, a fim de que a zona explorada pelas raízes possa ser maior e possa estar distribuída por todo o volume de solo.

Segundo Pereira (2004), a rega gota-a-gota tem como principais vantagens a elevada eficiência de aplicação (Figura 26) e a economia de água, por sua vez a sua principal desvantagem é o facto de ter um custo inicial muito elevado.

Sistemas de rega	Eficiências (%)
• Rega de gravidade com nivelamento de precisão	
— sulcos	65 – 85
— faixas	70 – 85
— canteiros	70 – 90
• Rega de gravidade tradicional	
— sulcos	40 – 70
— faixas	45 – 70
— canteiros	45 – 70
• Rega de arroz, canteiros em alagamento permanente	25 – 70*
• Rega por aspersão	
— sistemas estacionários de cobertura total	65 – 85
— sistemas estacionários deslocáveis manualmente	65 – 80
— rampas com rodas	65 – 80
— aspersores canhão com enrolador ou com cabo	55 – 70
— rampas móveis, com pivot central	65 – 85
• microrrega (rega localizada)	
— gotejadores, ≈ 3 emissores por planta (pomares)	85 – 95
— gotejadores, < 3 emissores por planta	80 – 90
— micro-aspersores e “bubblers” (pomares)	85 – 95
— linha contínua de emissores gota-a-gota	70 – 90

* Os valores mais baixos referem-se a canteiros tradicionais, mal nivelados e sem adequado controlo da lâmina de água do canteiro, enquanto os mais altos se referem a canteiros de grandes dimensões, bem nivelados e com bom controlo da lâmina de água.

Figura 26 - Valores indicativos das eficiências de aplicação para sistemas de rega bem projetados e bem mantidos (Fonte: Pereira, 2004)

3.2. Descrição do Problema e seleção do material vegetal

Identificaram-se diversas árvores com sintomatologia típica de stress hídrico, em que as árvores apresentavam folhas e ramos secos. Observações mais pormenorizadas revelaram que os sintomas começaram por manifestar-se nos ramos superiores das árvores afetadas, iniciando-se com clorose (Figura 27 A), seguida de necrose dos tecidos das folhas (Figura 27 B). Após a queda das folhas necróticas (Figura 27 C), os ramos superiores acabavam por também secar, sendo que após um corte transversal eram visíveis anéis necróticos no interior do lenho dos ramos (Figura 27 D e E). Dos ramos, os sintomas passavam para o tronco e raízes, e também para as árvores mais próximas, levando à morte generalizada das árvores jovens. Foi também visível o aparecimento de várias gomoses (Figura 27 F) de grandes dimensões em grande parte das plantas que apresentavam sintomas da doença (Figura 27 G e H).

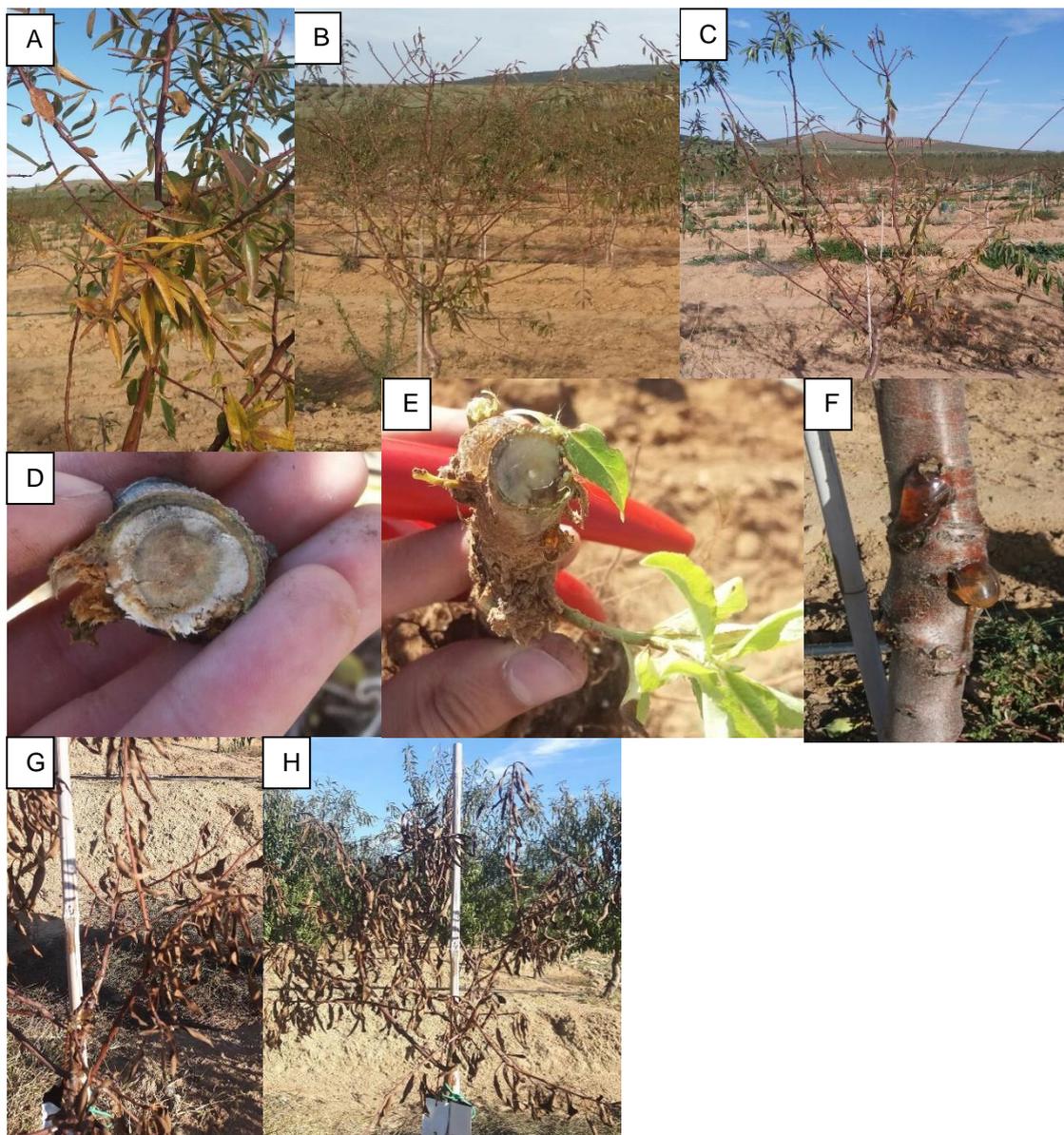


Figura 27 - Exemplo das sintomatologias encontrada em amendoeiras jovens presentes nos locais A e B e nas cultivares Lauranne Avijor e Soleta. A – Cloroses; B – Necroses dos tecidos das folhas; C – Queda das folhas necroticas; D e E – Anéis necroticos no interior do lenho; F – Gomoses; G e H – Morte das plantas.

3.3.Recolha de material vegetal

Em cada um dos locais (A e B) foram recolhidas amostras de duas cultivares, *Lauranne Avijor* e *Soleta*, em três partes distintas das árvores marcadas para este estudo, ou seja, folhas, raízes e troncos. Também em cada cultivar foram amostradas plantas com sintomas sugestivos de doença e plantas assintomáticas, sendo que no total foram amostradas 54 plantas em cada local, fazendo um total de 108 plantas. Para facilitar a recolha das amostras as plantas selecionadas para a amostragem foram agrupadas em

blocos. A figura 28 mostra esquematicamente como foram agrupados os blocos para o local A e B. Cada bloco apresenta cinco árvores associadas na mesma linha de plantação, exceto os blocos 7, 8 e 9 que apresentam apenas três árvores associadas na mesma linha de plantação, isto deve-se ao facto de ter existido dificuldade em encontrar árvores da cultivar *Soleta* que apresentassem sintomas típicos de doença.

As amostras foram recolhidas durante os meses de novembro de 2017 a janeiro de 2018. A tesoura de poda e a pá usadas para a recolha das amostras foram devidamente desinfetadas entre cada recolha para evitar contaminações. Depois de selecionadas as amostras foram identificadas e colocadas em sacos, tendo a sua conservação sido efetuada a 4°C até à data do seu processamento.

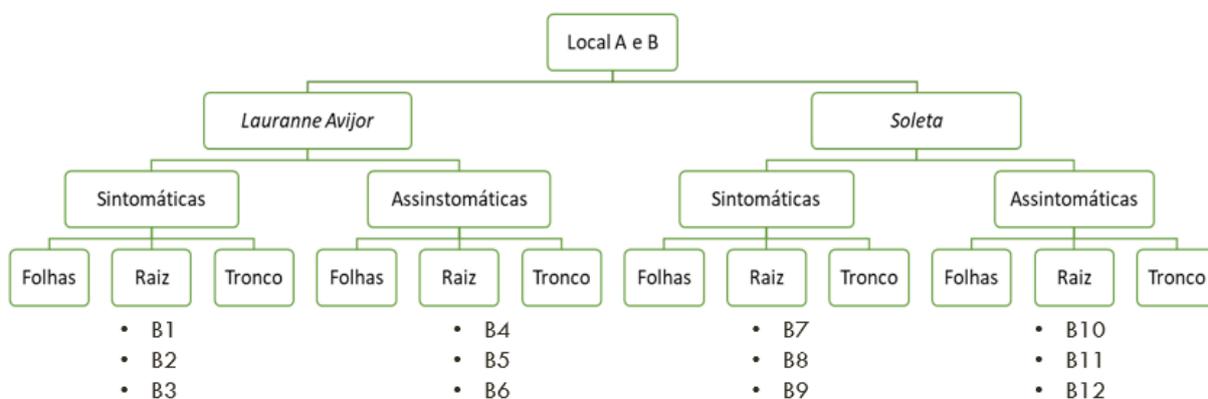


Figura 28 - Esquema da recolha de amostras de material vegetativo no local A e B.

3.4.Recolha de material edáfico

De cada um dos blocos onde foram recolhidas as amostras de material vegetativo, foram também recolhidas amostras de solo, da linha e de entrelinha de plantação onde estão situados os respetivos blocos, ou seja, duas amostras por cada bloco, 24 amostras por local e 48 amostras no total, de modo a identificar quais os microrganismos fitopatogénicos presentes nesses solos. A amostragem dos solos foi realizada simultaneamente à recolha do material vegetal, com recurso a uma sonda, que permitiu retirar o material edáfico correspondente aos primeiros 50 cm de solo. Entre as recolhas das amostras de cada bloco, a sonda foi devidamente lavada para evitar contaminações de um solo para outro. Após identificadas e colocadas em sacos as amostras foram guardadas no frigorífico a uma temperatura de 4°C até serem processadas.

3.5.Recolha de água de rega

Durante o mês de janeiro de 2018, foram recolhidas as amostras de água de rega dos locais A e B, uma amostra por cada local, para assim ser possível avaliar o estado sanitário deste elemento fundamental para as plantas. As amostras foram recolhidas diretamente das barragens que fornecem água aos diferentes locais, colocadas em garrafas previamente desinfetadas (cerca de 1 L de água por local) e identificadas. Após a recolha as amostras foram guardadas no frio, a cerca de 4°C, até à altura da sua análise em laboratório.

3.6.Isolamento de microrganismos provenientes do material vegetal

As operações realizadas no laboratório para o isolamento e purificação dos microrganismos foram todas executadas em bancadas, que foram previamente desinfetadas com álcool a 96% e junto à área de influência da chama do bico de Bunsen, com objetivo de cumprir as condições de assepsia e diminuição do risco de contaminação das amostras com outros microrganismos não desejados.

Todo o material usado neste trabalho foi sujeito a um ciclo de esterilização em autoclave (Uniclave 88, A.J. Costa), a uma temperatura de 120°C e a uma pressão de 1 atmosfera durante vinte minutos.

O material vegetal que havia sido guardado a uma temperatura de 4°C, foi sujeito a um ciclo de desinfecções, segundo o protocolo utilizado por Varanda *et al.* (2016). Começando por uma lavagem durante três minutos numa solução de álcool a 96% (v/v), seguida de uma lavagem em hipoclorito de sódio a 3% (v/v), durante mais três minutos, e por fim mais uma lavagem em álcool a 70% (v/v), por mais três minutos. Após ter sido desinfetado, o material vegetal foi lavado em três copos diferentes com água ultrapura, ficando o material vegetal um minuto em cada copo. Esta lavagem final tem o objetivo de remover o excesso de desinfetante que poderia ter ficado das desinfecções anteriores (Figura 29). No final do ciclo de lavagens as amostras foram secas com papel de filtro e fracionadas em 5 partes (Figura 30).

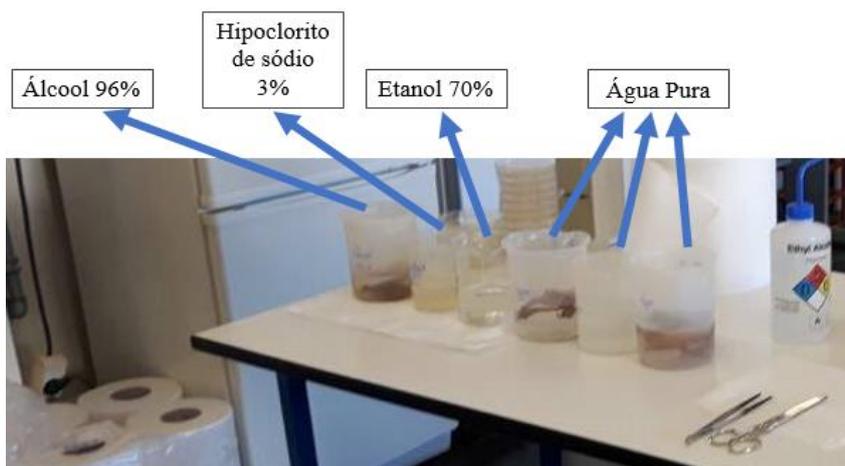


Figura 29 - Ciclo de desinfecção do material vegetal.



Figura 30 - Fracionamento do material vegetal.

O material vegetal depois de ser fracionado foi colocado em placas de Petri de 90 mm com o meio de cultura PDA (*Potato dextrose agar*), preparado segundo as instruções do fabricante. Todas as placas foram previamente identificadas e colocadas a incubar à temperatura 24°C, durante os dias necessários para ocorrer o crescimento dos microrganismos presentes naquela amostra.

Após o crescimento dos microrganismos nas placas de Petri, procedeu-se à sua repicagem para cultura pura para placas de Petri de 60 mm, contendo igualmente meio de cultura de PDA (Figura 31). Estas, foram também incubadas a 24°C até ao completo preenchimento da superfície da placa pelo microorganismo isolado, tendo sido posteriormente agrupadas, segundo as características morfológicas destes.

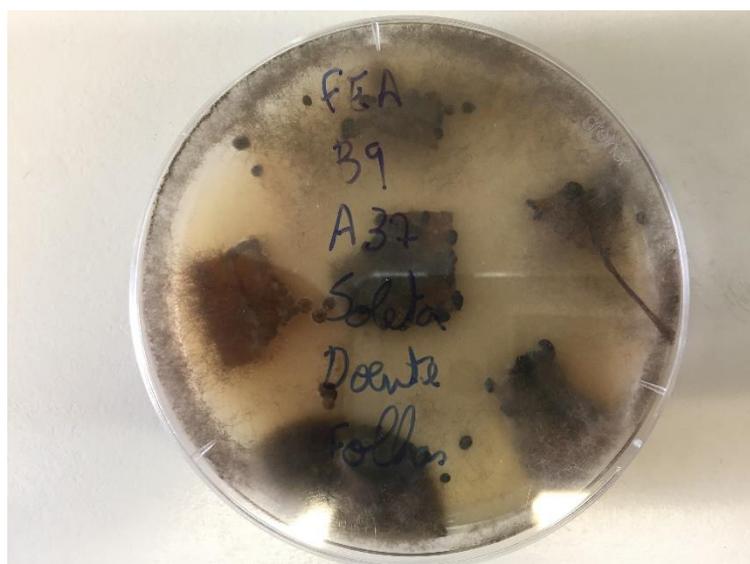


Figura 31- Placa de Petri de 90 mm identificada e após o crescimento de microrganismos.

3.7. Isolamento de microrganismos provenientes do material edáfico

Para isolar e identificar os fungos, principalmente os fitopatogénicos, presentes nas amostras de solo recolhidas, realizou-se uma suspensão das amostras de cada um dos solos em tinas com água destilada, sendo a proporção de 2 kg de solo para 3 L de água



Figura 32 - Amostras de material edáfico em suspensão.

(Figura 32). Para libertarem os possíveis microrganismos que estivessem presentes nos agregados do solo, as suspensões foram homogeneizadas de vinte em vinte minutos, durante duas horas, com recurso a uma vareta de vidro. Seguidamente as suspensões de solo foram deixadas em repouso durante trinta minutos, para que ocorresse a sedimentação, e a maioria das partículas de solo fossem depositadas no fundo, ficando assim os possíveis microorganismos presentes em suspensão. Após estes trinta minutos, e com uma pipeta Pasteur, foram retirados de cada uma das suspensões 4 mL de sobrenadante, que foi repartido em quatro placas de Petri de 90 mm com meio de cultura de PDA (1mL de sobrenadante por cada placa). As placas de Petri foram deixadas a incubar a 24°C durante os dias necessários para haver crescimento visível dos microrganismos.

Após crescerem, os microrganismos obtidos foram repicados para cultura pura em

placas de Petri de 60 mm com meio de cultura PDA. Tal como feito com as placas do material vegetal, também as placas de Petri de 60 mm contendo os isolados do solo foram agrupadas segundo as características morfológicas dos mesmos.

3.8. Isolamento de microrganismos presentes na água de rega

Para o isolamento dos microrganismos presentes na água, as amostras recolhidas nos locais de produção (local A e B) foram divididas em quatro copos de centrifugação para cada local, todos com o mesmo volume de água e centrifugados durante 15 minutos, a uma velocidade de 7000 rpm, utilizando a centrífuga (Sorvall LYNX 4000, Thermo Scientific). O objetivo desta centrifugação foi o de fazer com que ocorresse a precipitação e concentração de microrganismos presentes na água, no fundo dos copos de centrifugação. No final da primeira centrifugação o sobrenadante foi praticamente todo descartado dos quatro copos de centrifugação e o resto desse sobrenadante foi misturado, juntamente com o precipitado correspondente, em dois copos de centrifugação diferentes. Esses dois copos de centrifugação foram novamente centrifugados, nas mesmas condições da centrifugação anterior. No final desta segunda centrifugação, o conteúdo presente nos dois copos de centrifugação misturou-se num só copo de centrifugação, e voltou-se a verter praticamente todo o sobrenadante. O copo de centrifugação contendo o precipitado com uma pequena quantidade de água foi agitado, para voltar a suspender o precipitado, e foram retirados 4mL, com uma pipeta Pasteur, que foram distribuídos em quatro placas de Petri de 90 mm diferentes (1mL por cada placa) com meio de cultura de PDA, essas placas foram deixadas à temperatura de 24°C para incubação e crescimento dos possíveis microrganismos. Tal como para as amostras de material vegetal e material edáfico, também os crescimentos de microrganismos das amostras de água de rega foram repicadas para cultura pura, em placas de Petri de 60 mm. Estas foram agrupadas segundo as características morfológicas dos isolados obtidos.

3.9. Identificação molecular dos microrganismos isolados no material vegetal, edáfico e água de rega

A partir das culturas puras obtidas do material vegetal, edáfico e de rega, foram selecionados os que apresentavam um aspeto semelhante a fungos, tendo sido selecionados para identificação molecular. De cada um destes microrganismos procedeu-

se à extração do DNA total. Para isso, uma porção de micélio foi retirado com a ajuda de um bisturi desinfetado (álcool a 70% e à chama do bico de Bunsen), e colocado num almofariz de porcelana estéril, onde foi macerado na presença de azoto líquido (Figura 33). A amostra resultante é rapidamente guardada em microtubos de 2 mL, previamente identificado com o número da amostra, e congelada a -20°C até à sua posterior utilização (Figura 34).



Figura 33 - Utilização de azoto líquido para a maceração dos microorganismos.



Figura 32 - Colocação de um microorganismo macerado num microtubo de 2 mL.

A extração do DNA total das culturas foi feita segundo o método CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas alterações. A cerca de 100 mg de cada fungo macerado e congelado a -20°C adicionou-se 600 μL de tampão de extração CTAB 2% (20 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH8,0, 1,4 M NaCl, 2% de CTAB, 4% de PVP, 0,1% de β -mercaptoetanol adicionados imediatamente antes da sua utilização e 0,5% de Proteinase K). A suspensão foi depois incubada durante 90 minutos a 55°C , e misturada por inversão a cada 15 minutos. Após esta incubação estar terminada, foram adicionados a cada tubo 600 μL de clorofórmio-

álcool isoamílico (24:1) e os microtubos foram novamente agitados durante cerca de 8 a 10 min. Após serem agitados, os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm (Centrifuga 5415R, Eppendorf) durante 10 minutos e o sobrenadante foi recuperado para novos microtubos, tendo-se adicionado depois 2,5 volume de etanol absoluto frio (800 µL). As amostras foram suavemente homogeneizadas por inversão e novamente centrifugadas a 13000 rpm (Centrifuga 5415R, Eppendorf) durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e o ‘pellet’ lavado com 500 µL de etanol a 70% de modo a eliminar os resíduos de sais aderentes ao DNA. Seguiu-se nova centrifugação a 13000 rpm (Centrifuga 5415R, Eppendorf) durante 15 minutos tendo o sobrenadante sido descartado. O ‘pellet’ resultante vai a secar a 55°C até os restos de etanol evaporarem, na centrifuga ‘speed vacuum’ (CentriVap micro IR, Labconco). Por fim, ao ‘pellet’ seco foram adicionados 30 µL de água ultrapura e o DNA total conservado a -20°C até à sua posterior utilização.

O DNA total obtido anteriormente foi sujeito a PCR (‘Polymerase Chain Reaction’ – Reação da polimerase em cadeia), para amplificação da região ITS (‘Internal Transcribed Spacer’) (Figura 35) a partir do DNA genómico usando os ‘primers’ universais ITS1 (5’ TCC GTA GGT GAA CC TGC GG 3’) e ‘primer’ ITS4 (5’ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3’) (White *et al.*, 1990).

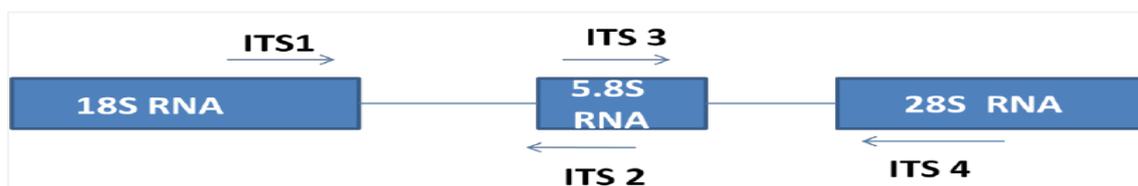


Figura 35 - Região de rDNA com a localização dos primers ITS1 e ITS4 (Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Location-of-Internal-Transcribed-Spacer-sequence-1-2-a-and-the-position-of-primers_fig1_270564947).

Para a identificação dos fungos dos géneros *Fusarium*, utilizaram-se para além dos ‘primers’ ITS 1 e ITS4 outros que amplificavam uma região do gene da β-tubulina T1 (5’-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3’) e T22 (5’-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3’) (’Donnell and Cigelnik *et al.*, 1997).

As reações de PCR consistiram na adição de 30 a 80 mg de DNA genómico dos fungos, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Thermo), 1 µM de cada ‘primer’ e 2,5 U de Dream Taq DNA polimerase (Thermo) num total de 50 µL de reação total. A amplificação foi feita utilizando um termociclador

MyCycler (Bio-Rad) a 95°C durante 3 min, seguidos de 39 ciclos de 95°C durante 30 seg, 55°C durante 45 seg e 72°C durante 2 min e a extensão final a 72°C durante 10 min. Para a amplificação do gene da β -tubulina, houve necessidade de ajustar a temperatura de hibridação dos 'primers' para 60°C em vez dos 55°C (Laurence *et al*, 2013).

Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram analisados através da electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,5X: 1,1M Tris; 900mM Borate; 25mM EDTA; pH 8,3) com uma voltagem constante de 80V, durante aproximadamente 1 hora, como referência utilizou-se o marcador 1 kb DNA Ladder (Thermo).

Os produtos do PCR depois de analisados foram purificados, utilizando o kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante e seguidamente enviadas para sequenciação na empresa Macrogen (Holanda). Todas as amostras foram sequenciadas em ambas as direções.

Os resultados da sequenciação foram analisados com o programa "BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3" (Hall, 1999). A procura por sequências homólogas foi feita usando a base de dados "Basic Local Alignment Search Tools" (BLAST N) do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). Sempre que possível as sequências foram identificadas até à espécie e com um grau de semelhança o mais próximo possível dos 100% (entre os 97% e os 100%).

3.10. Análise estatística

Para a análise estatística foram realizadas as análises univariada e multivariada para detectar as diferenças significativas na abundância total das OTUs da comunidade endofítica em grupos de 5 amendoeiras nos locais; "A e B", cultivares; "*Lauranne Avijor e Soleta*", sintomatologia; "sintomáticas e assintomáticas" e órgãos das plantas; "raiz, tronco e folhas". As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software PRIMER v6 (Clarke e Warwick, 2001) com o software complementar PERMANOVA (Anderson *et al.*, 2008). O número total de OTUs em cada agrupamento de 5 amendoeiras foi calculado usando o conjunto de dados dos dois locais nas três cultivares (doentes e não doentes) e nos três tipos de órgãos das plantas. Uma análise permutacional de variância de quatro vias (PERMANOVA) foi aplicada para testar a hipótese de existirem diferenças significativas no número total de fungos endofíticos por grupos de 5 amendoeiras entre os locais e entre as três cultivares (sintomáticas e assintomáticas) e

entre os três tipos de órgãos das plantas. A análise PERMANOVA foi realizada seguindo o modelo de quatro fatores: locais; "A e B", cultivares (2 níveis, fixos); "*Lauranne Avijor* e *Soleta*" (2 níveis aleatórios), sintomatologia; "Sintomáticas e assintomáticas" (2 níveis aleatórios) e órgãos das plantas; "raiz, tronco e folhas" (3 níveis aleatórios). Os dados totais foram transformados utilizando a raiz quadrada, a fim de reduzir a importância das réplicas altamente abundantes e, portanto, aumentar a importância das menos abundantes na análise de similaridade. A análise PERMANOVA foi conduzida em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis (Clarke e Green, 1988). A hipótese nula foi rejeitada a um nível de significância $<0,05$ (se o número de permutações fosse menor que 150, uma permutação de Monte Carlo p foi usada). Sempre que foram detetadas interações significativas nos efeitos dos fatores, estas foram examinadas usando comparações *a posteriori*, usando 9999 permutações sob um modelo reduzido.

4. Resultados

4.1. Isolamento e identificação de isolados de fungos obtidos no material vegetal

Neste trabalho foram recolhidas e analisadas 324 amostras obtidas de 108 árvores, pertencentes aos locais A e B. Em cada local foram amostradas duas cultivares de amendoeiras (*Lauranne Avijor* e *Soleta*) e em cada cultivar as amostragens foram divididas em árvores sintomáticas e não sintomáticas. Ainda, em cada árvore, foram recolhidas amostras de três zonas diferentes (folhas, raízes e tronco). Nestas 324 amostras foram encontrados um total de 1409 fungos, destes, 99,93% foram identificados com sucesso através da amplificação e sequenciação da região ITS. O tamanho dos produtos amplificados variou entre 500 a 700 pb (Figura 36). Para o caso específico dos fungos do género *Fusarium*, foi necessário amplificar e sequenciar uma região de cerca de 1500 pb do gene da β -tubulina (Figura 37).

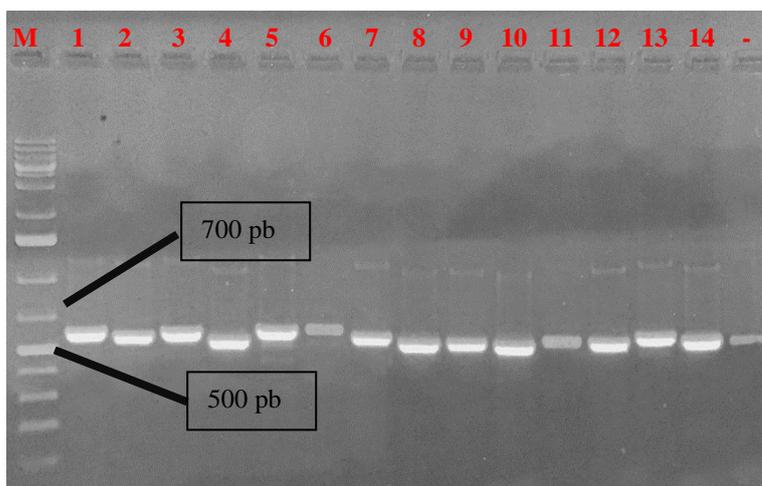


Figura 36 - Análise electroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos de amplificação da região ITS, tendo-se utilizado os primers universais ITS1 e ITS4, usando DNA extraído (1 a 14) de fungos isolados de amostras de material vegetal; - - controle negativo; M – marcador GeneRuler 1 Kpb DNA Ladder; resultante num produto com o tamanho esperado entre 500 e 700 pb.

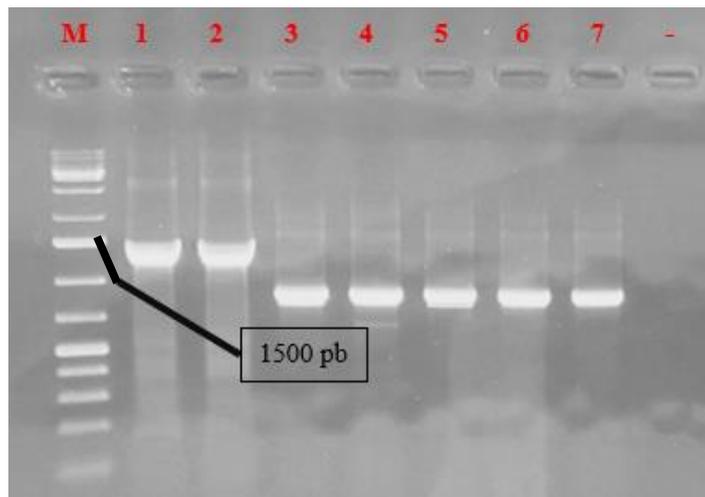


Figura 37 - Análise electroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos de amplificação de uma porção do gene da β -Tubulina , usando DNA extraído (1 a 7) de fungos isolados de amostras de material vegetal; - - controlo negativo; M – marcador GeneRuler 1 Kpb DNA Ladder; resultante num produto com o tamanho esperado de 1500 pb.

4.2. Isolamento e identificação de *Fusarium* spp. no material edáfico

No material edáfico amostrado optou-se por isolar e purificar apenas fungos da espécie *Fusarium*. As características observadas foram as cores das colónias, desde o cor-de-rosa ao roxo e a forma dos esporos que após observação ao microscópio ótico, mostraram ser do tipo conídeos, micro e macroconídeos. Assim, isolou-se um total de 35 isolados de *Fusarium* spp., de onde se identificaram três espécies diferentes. No local A obtiveram-se 16 isolados, destes 14 isolados foram identificados ao nível do género *Fusarium* spp., e os outros dois isolados identificados ao nível da espécie, uma como *Fusarium oxysporum* e outra como *Fusarium equiseti*. No local B foram obtidos 19 isolados, 10 isolados foram identificados ao nível do género *Fusarium* spp., e os outros 9 isolados foram identificados ao nível da espécie; 3 como *Fusarium chlamydosporum*, 4 como *Fusarium oxysporum* e 2 como *Fusarium equiseti* (Figura 38).

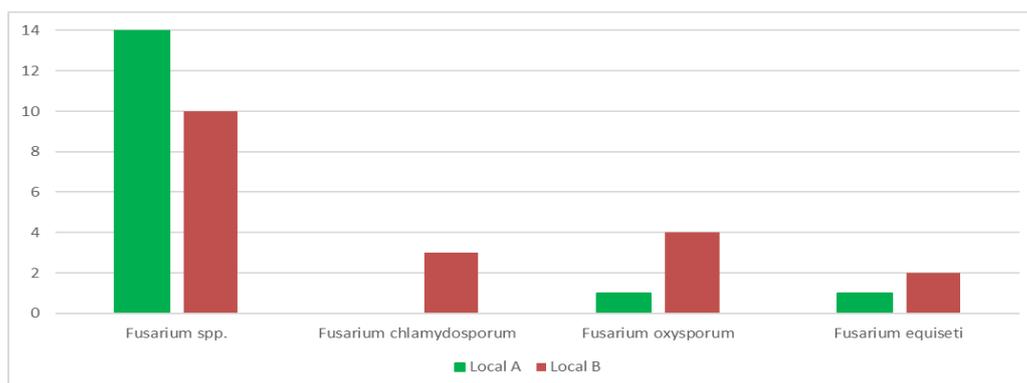


Figura 38 - Número total de isolados e espécies de *Fusarium* presentes no material edáfico no local A e no local B.

Ao relacionar o total de isolados de *Fusarium* obtidos no material edáfico com as cultivares em cada local verificou-se que: No local A, no solo da cultivar *Lauranne* foram encontrados 8 isolados de *Fusarium*, sendo que 7 foram identificados ao nível do género e somente 1 isolado ao nível da espécie, como *Fusarium oxysporum*. No solo da cultivar *Soleta* encontraram-se 8 isolados de *Fusarium*, destes, 7 foram identificados ao nível do género e somente 1 isolado ao nível da espécie, como *Fusarium equiseti* (Figura 39). No local B, no solo da cultivar *Lauranne* encontraram-se 11 isolados de *Fusarium*, sendo que 7 isolados foram identificados ao nível do género, 2 como pertencentes à espécie *Fusarium chlamydosporum* e 2 de *Fusarium oxysporum*. No solo da cultivar *Soleta* encontraram-se 8 isolados de *Fusarium*, sendo que destes, 3 foram identificados ao nível do género, 1 pertencente à espécie *Fusarium chlamydosporum*, 2 à espécie *Fusarium oxysporum* e 2 à espécie *Fusarium equiseti* (Figura 40).

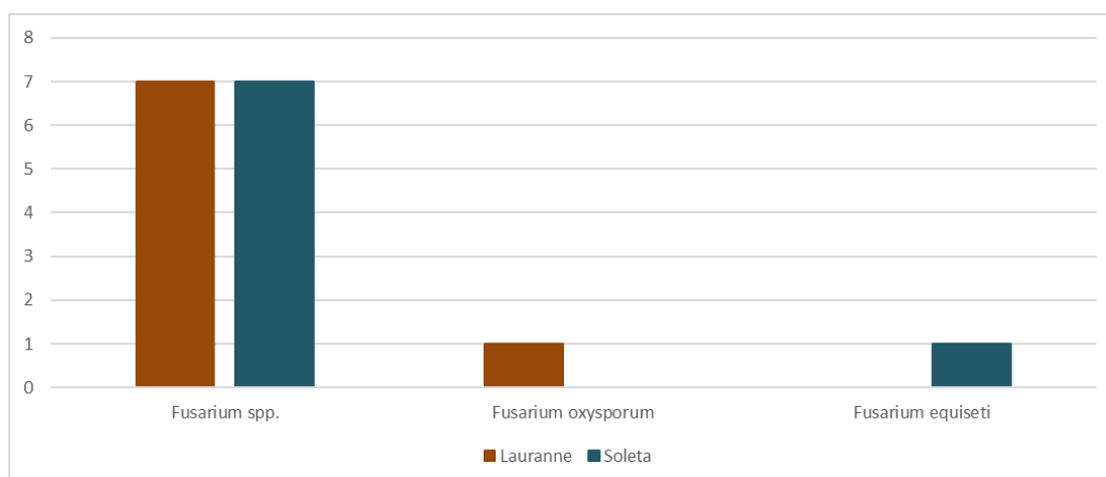


Figura 39 - Número de isolados e espécies de *Fusarium* obtidos, por cultivar, presentes no material edáfico no local A.

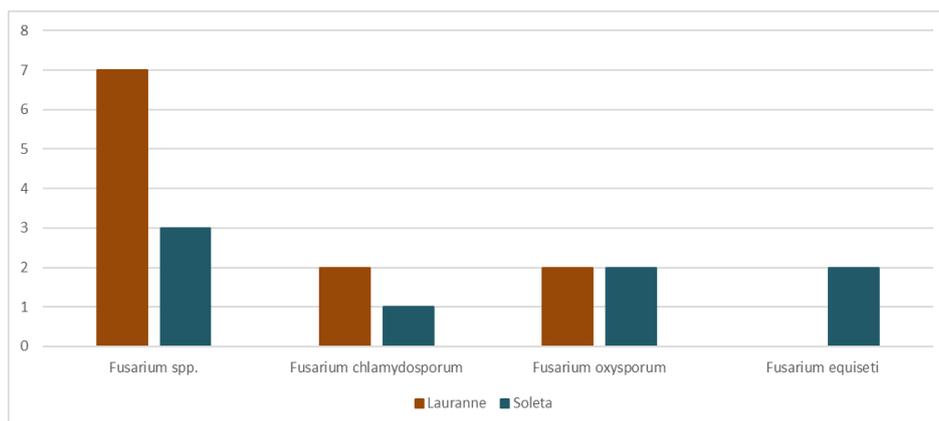


Figura 40 - Número de isolados e espécies de *Fusarium* obtidos por cultivar, presentes no material edáfico no local B.

Ao relacionar os isolados de *Fusarium* obtidos no material edáfico com facto das plantas estarem sintomáticas ou assintomáticas em cada local e cultivar, observou-se que: No local A, a cultivar *Lauranne*, apresentou 2 isolados de *Fusarium* no solo de plantas sintomáticas, que foram só identificados ao nível do género. Seis isolados de *Fusarium* no solo onde se encontravam as plantas assintomáticas, destes, 5 isolados foram identificados também ao nível do género e 1 pertencente à espécie *Fusarium oxysporum* (Figura 41). Ainda no local A, mas na cultivar *Soleta*, foram encontrados 4 isolados de *Fusarium*, obtidos no solo de plantas sintomáticas, e todos identificados até ao nível do género (Figura 41). No solo das plantas assintomáticas da cultivar *Soleta*, foram encontrados 4 isolados de *Fusarium*, sendo que 3 foram identificados ao nível do género e 1 identificado como pertencente à espécie *Fusarium equiseti* (Figura 41).

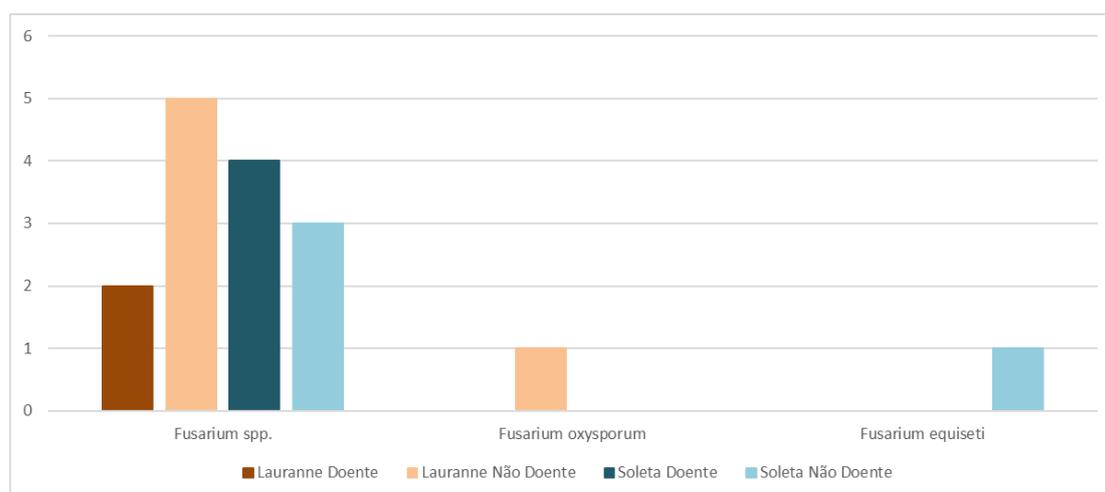


Figura 41 - Número de isolados e espécies de *Fusarium*, por cultivar sintomática e não sintomática, presentes no material edáfico no local A.

No local B, o solo da cultivar *Lauranne* sintomática, apresentou 8 isolados de *Fusarium*, destes, 5 foram identificados ao nível do género, 2 identificados com pertencentes à espécie *Fusarium chlamydosporum* e 1 como sendo da espécie *Fusarium oxysporum* (Figura 42). O solo da cultivar *Lauranne* com plantas assintomáticas apresentou 3 isolados de *Fusarium*, sendo que 2 forma identificados ao nível do género *Fusarium* e 1 foi identificado como pertencendo a espécie *Fusarium oxysporum* (Figura 42). Já o solo da cultivar *Soleta* sintomática apresentou 1 isolado de *Fusarium* que foi identificado como pertencendo a espécie *Fusarium oxysporum*. O solo da cultivar *Soleta* assintomática apresentou 7 isolados de *Fusarium*, sendo que 5 foram identificados ao nível do género, 1 identificado com pertencendo a espécie *Fusarium chlamydosporum*, 1 como *Fusarium oxysporum* e 2 como *Fusarium equiseti* (Figura 42).

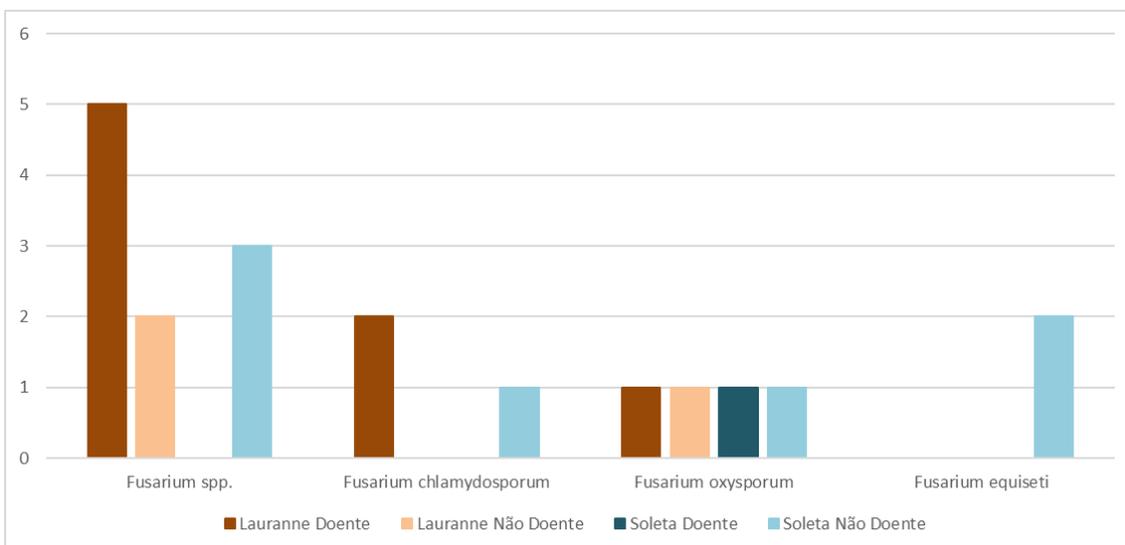


Figura 42 - Número de isolados e espécies de *Fusarium*, por cultivar sintomática e não sintomática, presentes no material edáfico no local B.

Dos resultados obtidos podemos verificar que a espécie mais prevalente nos solos analisados foi o *Fusarium oxysporum* (Quadro 7).

Quadro 7 - Identificação dos isolados de *Fusarium* por local (A e B), por cultivar (*Lauranne* e *Soleta*) e por sintomatologia (Sintomáticas e assintomáticas).

<u>Locais</u>	<u>Variedade</u>	<u>Sintomatologia</u>	<u>Identificação da espécie</u>
Local A	Lauranne	Sintomática	<i>Fusarium</i> spp.
		Assintomática	<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Fusarium oxysporum</i>
	Soleta	Sintomática	<i>Fusarium</i> spp.
		Assintomática	<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Fusarium equiseti</i>
Local B	Lauranne	Sintomática	<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Fusarium chlamydosporum</i>
			<i>Fusarium oxysporum</i>
	Soleta	Assintomática	<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Fusarium oxysporum</i>
		Sintomática	<i>Fusarium oxysporum</i>
			<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Fusarium chlamydosporum</i>
			<i>Fusarium equiseti</i>

4.3. Isolamento e identificação de *Fusarium* spp. na água de rega

Tal como para o material edáfico, também para a água de rega se optou por isolar e identificar apenas os fungos isolados com características do género *Fusarium*. No local A, foram identificados 3 isolados de *Fusarium* sendo que 1 foi identificado ao nível do género, 1 identificado como pertencendo a espécie *Fusarium verticillioides* e 1 como *Fusarium oxysporum*. No local B, foram identificados 2 isolados de *Fusarium* sendo que 1 foi identificado ao nível do género e 1 identificado como pertencendo a espécie *Fusarium chlamydosporum* (Quadro 8) e (Figura 43).

Quadro 8 - Ausência (0) e presença (1) dos diferentes isolados de *Fusarium* na água utilizada para a rega nos locais A e B.

Identificação dos isolados	Local A	Local B
<i>Fusarium</i> spp.	1	1
<i>Fusarium verticillioides</i>	1	0
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	0	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0

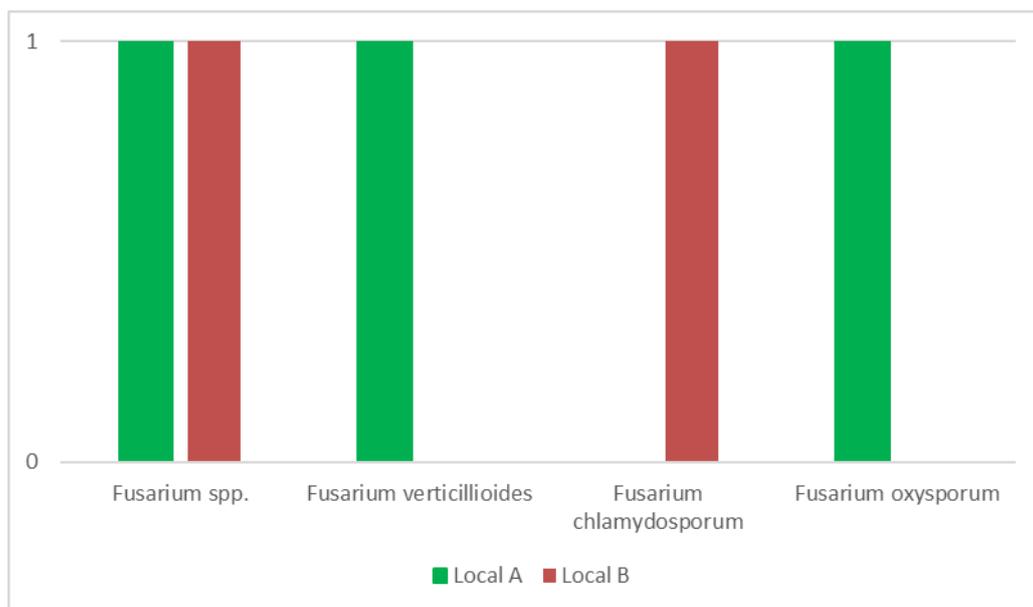


Figura 43 - Ausência (0) e presença (1) das diferentes espécies de Fusarium na água utilizada para a rega das plantas do local A e do local B.

4.4. Diversidade de fungos endofíticos encontrada nas plantas

De forma geral, os 1409 isolados de fungos foram identificados como pertencendo a 42 OTU's representando 27 géneros. A maioria dos isolados pertencem à Divisão *Ascomycota* (90,48%), que está representada por cinco classes, com a classe *Sordariomycetes* a ser a mais representada (44,74%), seguida das classes *Dothideomycetes* (36,48%), *Eurotiomycetes* (13,16%), e por fim as classes *Leotiomycetes* e *Ascomycetes* (ambas com 2,63%). As restantes Divisões estão representados apenas por uma OTU cada. A Divisão *Zygomycota* (2,38%) está representada pela classe *Zygomycetes*. Por sua vez, a Divisão *Mucoromycota* (2,38%) e a Divisão *Basidiomycota* (2,38%) estão representadas pelas classes *Umbelopsidomycetes* e *Agaricomycetes*, respetivamente. Houve ainda um fungo que não foi identificado (2,38%). Os isolados obtidos distribuem-se essencialmente por nove géneros (Figuras 44, 45 e 46): *Alternaria* (24,91%), *Fusarium* (18,67%), *Cladosporium* (11,76%), *Epicoccum* (10,93%), *Penicillium* (9,98%), *Rhizopus* (6,32%), *Purpureocillium* (3,41%), *Botrytis* (2,56%) e *Aureobasidium* (2,53%), juntos compreendem um total de 91,07% da totalidade de fungos isolados. Quanto às espécies encontradas foram cinco, o que representa 56,23%; sendo, *Alternaria* spp. (14,45%), *Cladosporium cladosporioides* (11,62%), *Epicoccum nigrum* (10,93%), *Penicillium* spp. (9,91%) *Fusarium* spp. (9,32%).

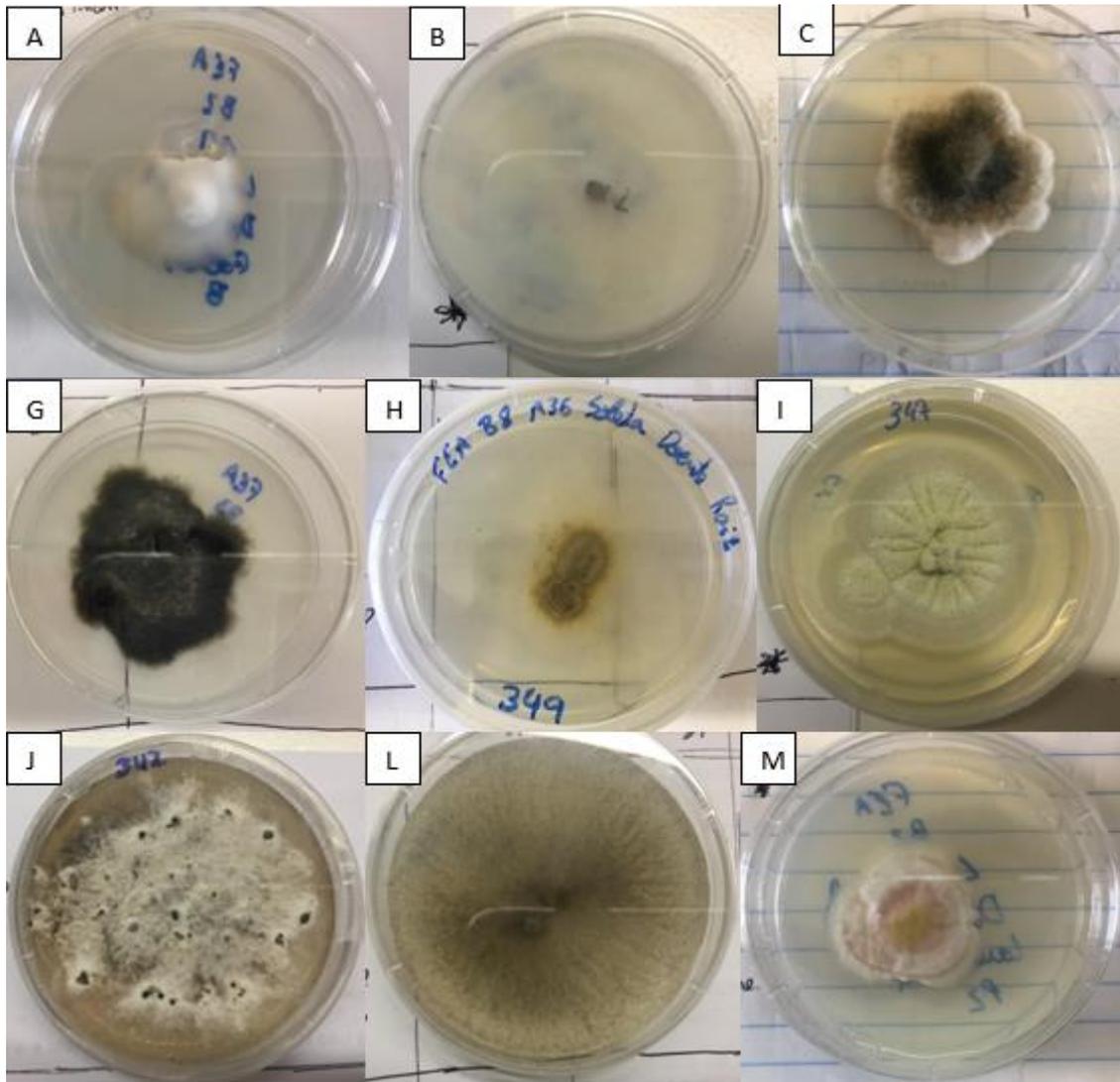


Figura 45 - Isolados encontrados no material vegetal e obtidos em cultura pura; A - *Phoma*; B - *Rhizopus*; C - *Boeremia*; D - *Bjerkandera*; E - *Truncatella*; F - *Talaromyces*; G - *Preussia*; H - *Byssochamys*; I - *Pseudogymnoascus*; J - *Diaporthe*; L - *Macrophomina*; M - *Umbelopsis*.

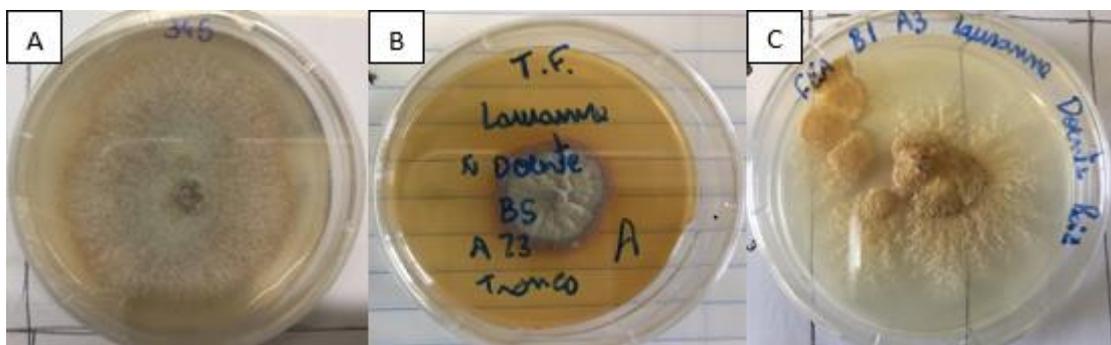


Figura 46 - Isolados encontrados no material vegetal e obtidos em cultura pura; A - *Ilyonectria*; B - *Chaetomium*; C - Não identificado.

Após a obtenção das culturas puras, foi extraído o DNA total dos isolados obtidos e procedeu-se à identificação molecular de cada um desses isolados de modo a ser possível conhecer quais as espécies que se encontravam associadas às sintomatologias apresentadas nas plantas e também as espécies endófitas presentes.

Deste modo, dos 1409 fungos encontrados, encontram-se 67 que apresentavam características morfológicas diferentes entre si (Quadro 9), 42 OTU's correspondendo a 47 fungos diferentes foram isolados no local A e 20 no local B.

Quadro 9 - Diversidade de fungos identificados após a análise BLAST N das sequências nucleóticas e número total de isolados de fungos por órgão vegetativo.

<u>Locais</u>	<u>Cultivar</u>	<u>Sintomatologia</u>	<u>Órgão Vegetativo</u>	<u>Identificação dos fungos</u>	<u>Nº total de fungos por órgão vegetativo</u>	
Local A	Lauranne	Sintomática	Folhas	<i>Epicoccum nigrum</i>	10	
				<i>Bjerkandera adusta</i>		
				<i>Curvularia spicifera</i>		
				<i>Alternaria alternata</i>		
				<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
				<i>Alternaria tenuissima</i>		
				<i>Alternaria spp.</i>		
				<i>Cladosporium ramotenellum</i>		
				<i>Rhizopus</i>		
				<i>Preussia africana</i>		
		Raiz	<i>Fusarium oxysporum</i>	4		
			<i>Penicillium spp.</i>			
			<i>Fusarium spp.</i>			
		Tronco	<i>Macrophomina phaseolina</i>	2		
			<i>Epicoccum nigrum</i>			
		Assintomática		Folhas	<i>Curvularia spicifera</i>	6
					<i>Talaromyces amestolkiae</i>	
					<i>Alternaria alternata</i>	
					<i>Purpureocillium lilacinum</i>	
					<i>Epicoccum nigrum</i>	
<i>Alternaria spp.</i>						
Raiz	<i>Alternaria infectoria</i>			5		
	<i>Fusarium oxysporum</i>					
	<i>Fusarium spp.</i>					
	<i>Fusarium equiseti</i>					
Tronco	<i>Diaporthe endophytica</i>	6				
	<i>Epicoccum nigrum</i>					
	<i>Chaetomium aureum</i>					
	<i>Epicoccum nigrum</i>					
	<i>Trichothecium roseum</i>					
<i>Fusarium oxysporum</i>	6					
<i>Aureobasidium pullulans</i>						
	<i>Alternaria spp.</i>					

	Soleta	Sintomática	Folhas	X	0
			Raiz	<i>Fusarium oxysporum</i>	2
				<i>Fusarium spp.</i>	
		Tronco	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	
		Assintomática	Folhas	X	0
			Raiz	<i>Truncatella angustata</i>	7
				<i>Fusarium chlamyosporum</i>	
				<i>Aspergillus europaeus</i>	
				<i>Fusarium spp.</i>	
				<i>Fusarium oxysporum</i>	
				<i>Diaporthe leucospermi</i>	
			Tronco	<i>Fusarium equiseti</i>	4
				<i>Boeremia exigua</i>	
<i>Epicoccum nigrum</i>					
			<i>Fusarium spp.</i>		
			<i>Alternaria infectoria</i>		
TOTAL					47
Local B	Lauranne	Sintomática	Folhas	<i>Phoma</i>	5
				<i>Preussia africana</i>	
				<i>Fusarium avenaceum</i>	
				<i>Fusarium flocciferum</i>	
				<i>Preussia spp.</i>	
		Raiz	<i>Penicillium spp.</i>	4	
			<i>Fusarium chlamyosporum</i>		
			<i>Ilyonectria spp.</i>		
		Tronco	Não indentificado	1	
	Assintomática	Folhas	<i>Diaporthe foeniculina</i>	1	
		Raiz	<i>Alternaria infectoria</i>	2	
			<i>Macrophomina phaseolina</i>		
		Tronco	<i>Botrytis cinerea</i>	1	
	Soleta	Sintomática	Folhas	<i>Alternaria alternata</i>	1
			Raiz	<i>Epicoccum nigrum</i>	1
Tronco			<i>Byssochlamys spectabilis</i>	1	
Assintomática		Folhas	<i>Rhizopus</i>	1	
		Raiz	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	2	
			<i>Epicoccum nigrum</i>		
Tronco	<i>Umbelopsis vinacea</i>	1			
			X	0	
TOTAL					20

Na Figura 47, pode observar-se que de todos os isolados analisados o que foi mais comumente encontrado foi o *Epicoccum nigrum*, com 8 isolados, estando presente nos dois locais e nas plantas sintomáticas e assintomáticas. Para além deste também se encontrou frequentemente fungos do género *Fusarium*, 17 isolados, em que 5 deles foram identificados como sendo *Fusarium oxysporum*.

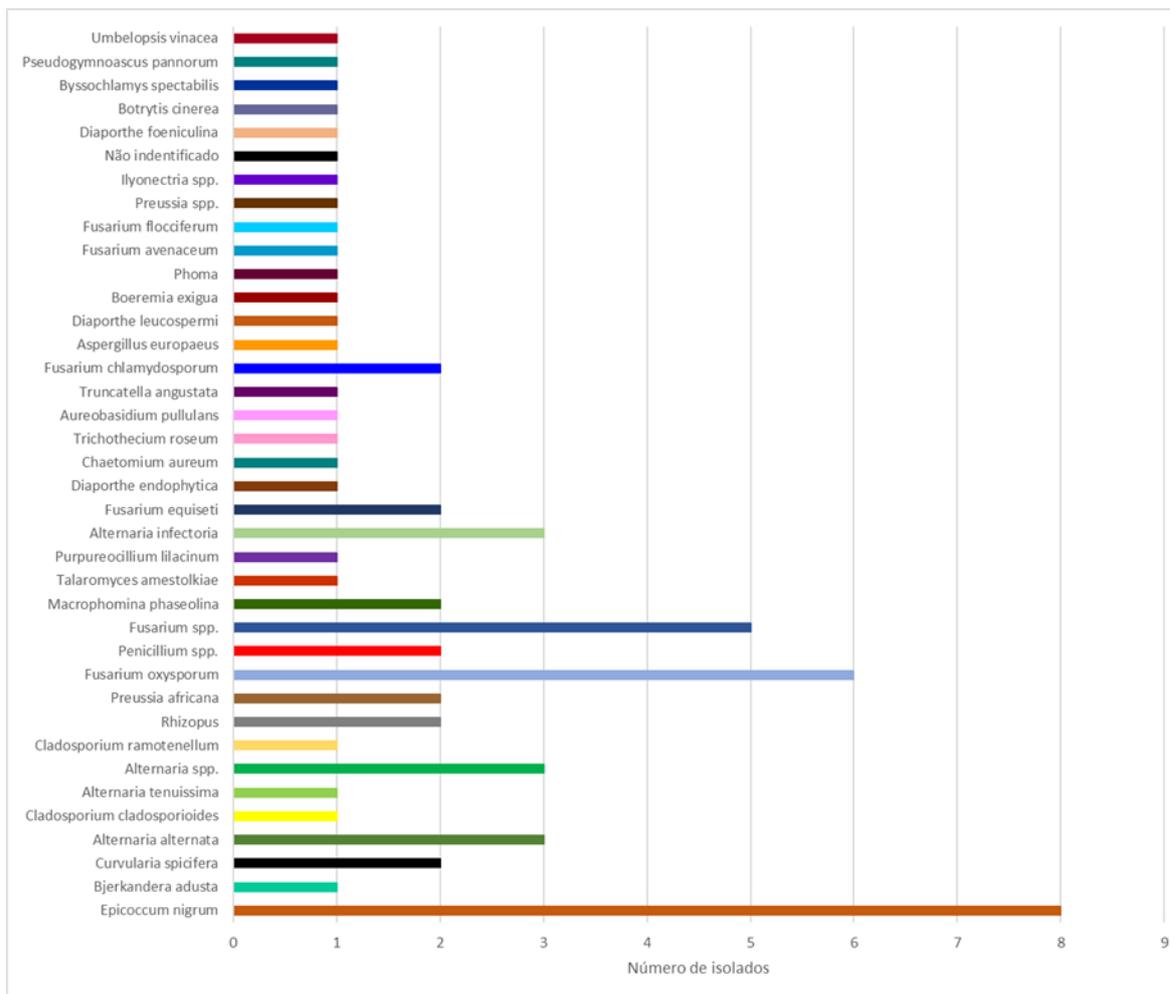


Figura 47 - Número de isolados de cada espécie após o BLAST.

Quando se analisou a diversidade endofítica encontrada em cada um dos locais, verificou-se que, no local A foram encontrados 718 fungos na totalidade, o que corresponde a um total de 32 OTU's (76,19% das 42 OTU's encontradas). A maioria dos isolados correspondem à Divisão *Ascomycota* (93,75%), que está aqui dividida em quatro classes, sendo a classe *Sordariomycetes* aquela que aparece mais representada (46,67%), seguida das classes *Dothideomycetes* (40%), *Eurotiomycetes* (10%), e por fim a classe *Leotiomycetes* (3,33%). As restantes Divisões estão representados por uma OTU cada um e estão repartidos da seguinte forma: *Zygomycota* (3,13%) e *Basidiomycota* (3,13%), as classes em estão inseridos os fungos encontrados são a classe *Zygomycetes* e a classe *Agaricomycetes*, respetivamente. Agrupando os fungos obtidos por géneros, verificou-se que estes se agrupam essencialmente em nove géneros diferentes que são os seguintes (Figuras 44, 45 e 46): *Alternaria* (20,47%), *Fusarium* (19,36%), *Epicoccum* (12,16%), *Cladosporium* (12,16%), *Penicillium* (7,06%), *Rhizopus* (7,01%), *Purpureocillium*

(5,20%), *Aureobasidium* (3,25%) e *Curvularia* (3,20%), fazendo um total de 89,87% da totalidade dos fungos isolados. Após a utilização do protocolo para identificação das espécies, as mais encontradas foram as seguintes: *Epicoccum nigrum* (12,16%), *Alternaria* spp. (12,02%), *Fusarium* spp. (11,98%), *Cladosporium cladosporioides* (11,88%) e *Penicillium* spp. (7,06%), que juntos fazem um total de 55,10% do total das espécies isoladas no local A.

No local B foram encontrados um total de 691 fungos, o que corresponde a um total de 27 OTU's (64,29% do total de OTU's encontradas em todo o estudo). A maioria dos fungos isolados correspondem à Divisão *Ascomycota* (88,89%), que está representado por cinco classes, as classes *Sordariomycetes* e *Dothideomycetes* a serem as classes mais representadas (41,67%), *Eurotiomycetes* (8,33%), e por fim as classes *Leotiomycetes* e *Ascomycetes* (ambas com 4,17%). As restantes Divisões estão representados por uma OTU cada uma. A Divisão *Zygomycota* (3,70%) está representada pela classe *Zygomycetes*, a Divisão *Mucoromycota* (3,70%) está representada pela classe *Umbelopsidomycetes*. Houve ainda um fungo que não foi identificado (3,70%), como tal não foi possível chegar à sua classificação taxonômica. De todos os isolados, os setes géneros mais representados foram: *Alternaria* (29,52%), *Fusarium* (17,95%), *Penicillium* (13,02%), *Cladosporium* (11,34%), *Epicoccum* (9,65%), *Rhizopus* (5,60%) e *Diaporthe* (3,28%), correspondendo a 90,36% do total de géneros encontrados. As cinco espécies mais encontradas no local B foram: *Alternaria* spp. (16,98%), *Penicillium* spp. (12,88%), *Alternaria alternata* (12,40%), *Cladosporium cladosporioides* (11,34%) e *Epicoccum nigrum* (9,65%), juntos fazem um total de 63,25% do total das espécies isoladas, no local B.

4.5. Análise da abundância de fungos endofíticos encontrada nas plantas

No local A, a média das abundâncias dos fungos \pm o erro padrão foi de 20.0 ± 0.78 (Figura 48). Na cultivar *Lauranne Avijor* a média das abundâncias dos fungos endofíticos \pm o erro padrão foi, de 22.06 ± 0.73 , e na cultivar *Soleta* foi de 17.83 ± 1.21 . A análise PERMANOVA não revelou diferenças significativas entre as cultivares *Lauranne Avijor* e *Soleta* ($p > 0.05$).

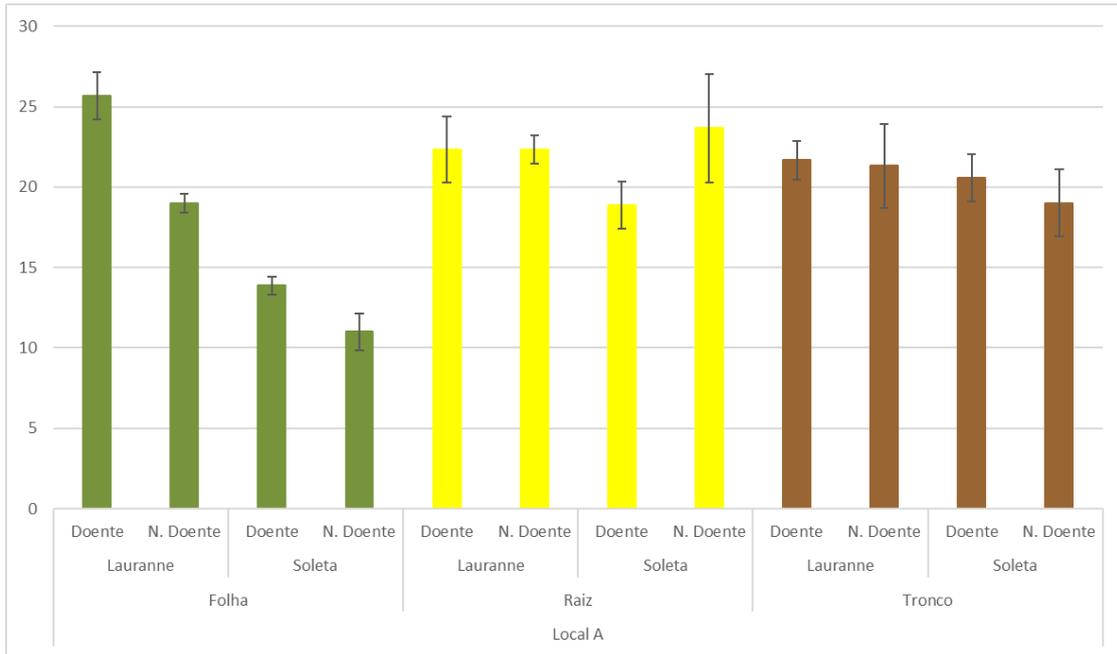


Figura 48 - Média de abundância de fungos encontrados nas plantas do local A e respectivo erro padrão.

Nas plantas sintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foi de 23.22 ± 0.71 e nas plantas assintomáticas foi de 20.89 ± 0.67 . A análise PERMANOVA não revelou diferenças significativas ($p > 0.05$) para a abundância de fungos endofíticos entre as plantas sintomáticas e não assintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor*. Nas plantas sintomáticas da cultivar *Soleta* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro foi de 17.18 ± 0.83 e nas plantas assintomáticas de 17.89 ± 1.56 . A análise PERMANOVA não revelou diferenças significativas ($p > 0.05$) para a abundância de fungos endofíticos entre as plantas sintomáticas e assintomáticas da cultivar *Soleta*.

Nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 25.67 ± 1.45 nas raízes de 22.33 ± 2.03 e nos troncos de 21.5 ± 1.20 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA revelaram diferenças significativas para a abundância de fungos endofíticos nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas entre as folhas e as raízes ($p < 0.0057$), entre as folhas e os troncos ($p < 0.002$), e entre as raízes e os troncos ($p < 0.0458$). Nos órgãos vegetativos das plantas assintomáticas a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 19 ± 0.58 , nas raízes de 22.33 ± 0.88 e nos troncos de 21.33 ± 2.60 . As comparações individuais

emparelhadas da análise PERMANOVA não revelaram diferenças significativas ($p > 0.05$) para a abundância de fungos endofíticos entre nenhum dos órgãos vegetativos das plantas não doentes.

Nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas da cultivar *Soleta*, a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 13.89 ± 0.55 , nas raízes de 18.89 ± 1.47 e nos troncos de 20.56 ± 1.47 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA não revelaram diferenças significativas ($p > 0.05$) para a abundância de fungos endofíticos entre nenhum dos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas. Nos órgãos vegetativos das plantas assintomáticas da cultivar *Soleta* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 11 ± 1.15 , nas raízes de 23.67 ± 3.38 e nos troncos de 19 ± 2.08 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA revelaram diferenças significativas para a abundância de fungos endofíticos nos órgãos vegetativos das plantas assintomáticas entre as folhas e as raízes ($p < 0.0097$), entre as folhas e os troncos ($p < 0.0064$), e entre as raízes e os troncos ($p < 0.0242$).

No local B, a média de abundância de fungos \pm o erro padrão foi de 19.5 ± 0.95 no local B (Figura 49). Na cultivar *Lauranne Avijor* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foi de 18.33 ± 1.45 , e na cultivar *Soleta* foi de 20.05 ± 1.23 . A análise PERMANOVA não revelou diferenças significativas entre as cultivares *Lauranne Avijor* e *Soleta* ($p > 0.05$).

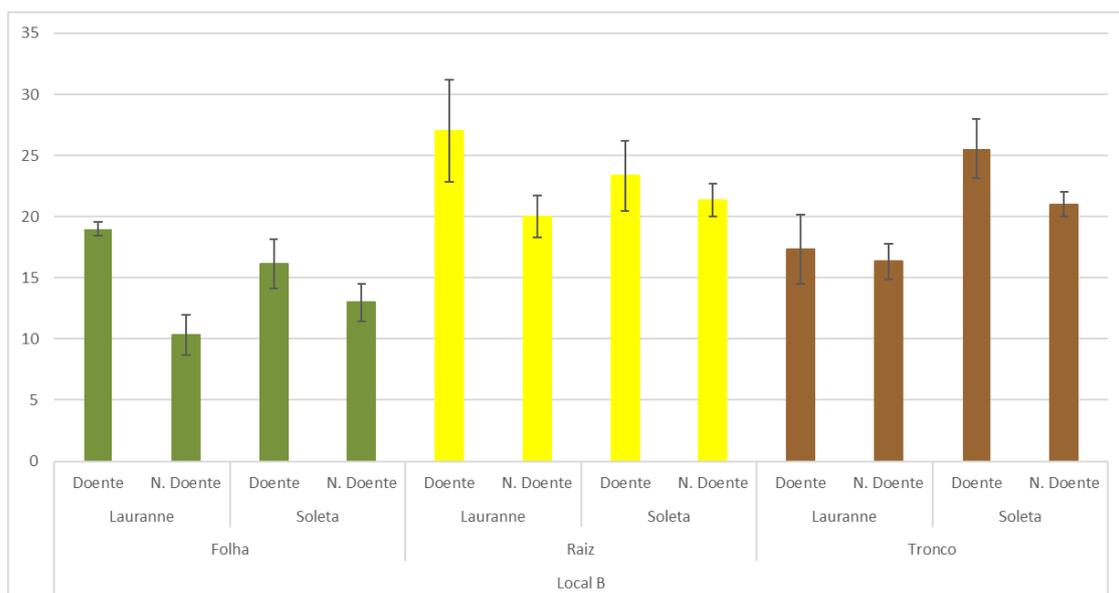


Figura 49 - Média de abundância de fungos encontrados nas plantas do local B e respectivo erro padrão.

Nas plantas sintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foi de 21.11 ± 1.48 e nas plantas assintomáticas de 15.56 ± 1.15 . A análise PERMANOVA não revelou diferenças significativas ($p > 0.05$) para a abundância de fungos endofíticos entre as plantas sintomáticas e assintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor*. Nas plantas sintomáticas da cultivar *Soleta* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foi de 21.67 ± 1.32 e nas plantas assintomáticas foi de 18.44 ± 1.07 . A análise PERMANOVA não revelou diferenças significativas ($p > 0.05$) para a abundância de fungos endofíticos entre as plantas sintomáticas da cultivar *Soleta*.

Nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor* a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 19 ± 0.58 , nas raízes de 27 ± 4.16 e nos troncos de 17.33 ± 2.84 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA revelaram diferenças significativas para a abundância de fungos endofíticos nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas entre as folhas e as raízes ($p < 0.0481$), entre as folhas e os troncos ($p < 0.0324$), e entre as raízes e os troncos ($p < 0.0338$). E nas plantas assintomáticas a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 10.33 ± 1.67 , nas raízes de 20 ± 1.73 e nos troncos de 16.33 ± 1.45 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA revelaram diferenças significativas para a abundância de fungos endofíticos nos órgãos vegetativos das plantas assintomáticas entre as folhas e as raízes ($p < 0.0267$), entre as folhas e os troncos ($p < 0.0479$), e entre as raízes e os troncos ($p < 0.0053$).

Nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas da cultivar *Soleta*, a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 16.11 ± 2.00 , nas raízes de 23.33 ± 2.89 e nos troncos de 25.56 ± 2.42 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA revelaram diferenças significativas para a abundância de fungos endofíticos nos órgãos vegetativos das plantas sintomáticas entre as folhas e as raízes ($p < 0.0632$), entre as folhas e os troncos ($p < 0.0428$), e nenhuma diferença foi encontrada entre as raízes e os troncos ($p > 0.2438$). E nas plantas assintomáticas a média da abundância de fungos endofíticos \pm o erro padrão foram nas folhas de 13 ± 1.53 , nas raízes de 21.33 ± 1.33 e nos troncos de 21 ± 1 . As comparações individuais emparelhadas da análise PERMANOVA revelaram diferenças significativas

para a abundância de fungos endofíticos nos órgãos vegetativos das plantas assintomáticas entre as folhas e as raízes ($p < 0.0115$), entre as folhas e os troncos ($p < 0.0253$), e entre as raízes e os troncos ($p < 0.023$).

5. Discussão de Resultados

No ano de 2017 amendoeiras das cultivares *Lauranne Avijor* e a *Soleta*, instaladas num modo de exploração super-intensivo, começaram a apresentar evidentes sintomas de stress hídrico e a presença de gomoses nos troncos, sintomatologia esta normalmente associada a um bloqueio dos feixes vasculares por fungos fitopatogénicos (Damm et al., 2007; Gramaje et al., 2012). Este processo criou uma oportunidade única de investigar quais os principais fungos fitopatogénicos associados à sintomatologia apresentada nas jovens plantas de amendoeira. Paralelamente foram também analisadas plantas assintomáticas das mesmas cultivares localizadas nas mesmas parcelas, com o objetivo de comparar os microorganismos isolados e compreender se as plantas assintomáticas apresentariam algum tipo de bioproteção que pudesse ser originada por fungos antagonistas dos fungos fitopatogénicos. Estes bioantagonistas funcionam impedindo a proliferação dos microorganismos nocivos por competição pelos locais de colonização, por nutrientes ou produzindo compostos tóxicos, que impedem a invasão da planta e a manifestação de sintomas (Pimenta *et al.*, 2012). Para além das plantas também foram analisados os solos e a água utilizada para a rega das plantas, para se poder perceber a possível origem dos microorganismos encontrados.

Das diferentes partes das plantas amostradas, raízes, troncos e folhas, foram isolados 1409 organismos com características morfológicas semelhantes a fungos, ou seja, com micélio pulverulento ou algodinoso. Aos morfologicamente diferentes fez a extração do DNA genómico e se procedeu à amplificação da região ITS, tendo-se obtido em todos os isolados o produto de amplificação esperado de 500 a 700 pb, típico de fungos, exceto num dos isolados em que não houve amplificação. Este facto pode ter sido devido à degradação do DNA ou à não hibridação dos ‘primers’ por falta de especificidade, o que implicaria tratar-se de outro organismo, por exemplo de uma levedura. Após a sequenciação da região ITS, verificou-se que 18,67% dos fungos isolados pertenciam ao género *Fusarium*. Os fungos deste género têm uma elevada homologia na região ITS, não se conseguindo identificar a espécie apenas com base nesta região. Assim, optou-se por amplificar uma porção do gene da β -tubulina, com cerca de 1500 pb. Esta região do DNA genómico dos fungos apresenta elevada especificidade por organismo podendo assim permitir conhecer a/es espécie/s presentes nas amendoeiras testadas. Várias espécies do género *Fusarium* estão associadas a doenças radiculares e/ou vasculares da maioria das plantas, das quais as prunoídeas não são exceção, estes fungos boqueiam os vasos do

xilema impedindo a passagem de água e de nutrientes para a parte aérea das plantas infetadas (Marek *et al.*, 2013; Úrbez-Torres *et al.*, 2016). Assim, as amostras de solo foram testadas apenas para avaliação dos fungos habitantes de solo nelas presentes, tendo-se encontrado, no local A as seguintes espécies pertencentes ao género *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. equiseti* e *F. chlamydosporum*. Houve, no entanto, alguns isolados de *Fusarium* em que não se conseguiu chegar à identificação da espécie, revelando-se nestes casos a amplificação da região ITS e do gene da β -tubulina insuficientes em especificidade para caracterizar estes microrganismos (Raja *et al.*, 2017).

Na água de rega estes agentes patogénicos também foram encontrados, no entanto, as espécies identificadas foram *F. verticillioides* e *F. chlamydosporum*, não se tendo detetado a presença de *F. equiseti*. A presença destes fungos patogénicos quer na água de rega, quer no solo pode ter originado a sua presença nas plantas, uma vez que estas espécies foram encontradas nos tecidos vegetais, principalmente na raiz e em alguns casos já a colonizar o tronco, como foi o caso de plantas de ambas as cultivares, sintomáticas e assintomáticas do local A.

No local B, apesar destes fungos estarem presentes no solo, não se verificou a sua presença na cultivar *Soleta*. O facto de não terem sido detetados estes fungos nos tecidos vegetais pode estar relacionado com; a sua não deteção por se encontrarem em baixa concentração, ou porque nestes tecidos, principalmente na raiz, detetou-se a presença de outros fungos com grande capacidade de antagonismo biológico, como é o caso de *Byssochlamys spectabilis* (Rodrigo *et al.*, 2017) e *Epicoccum nigrum* (Madrigal *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 2008). Na cultivar *Lauranne Avijor* apenas foi identificado o *F. chlamydosporum* nos tecidos da raiz de plantas sintomáticas. Para além desta espécie que se encontrava presente no solo foram ainda detetadas nas folhas as espécies *F. avenaceum*, que foi descrita como causadora da morte de amendoeiras, cujo a doença apresenta sintomas como; necroses nas raízes e ramos, descoloração dos feixes do floema e dessecação (Chehri *et al.*, 2010) e a espécie *F. flocciferum*, que foi descrita como provocando sintomas de podridão radicular e declínio da árvore em lenhosas perenes por Miao *et al.* (2015).

No local A, na cultivar *Lauranne Avijor* foi identificado o *Fusarium oxysporum*, no entanto esta espécie de fungo também foi encontrada em tecidos de raiz e de tronco de plantas que não apresentavam qualquer sintomatologia de doença. O facto de um fungo

da mesma espécie estar a colonizar plantas sintomáticas e assintomáticas pode ser justificado de duas formas; 1) ou estamos em presença de duas estirpes diferentes da mesma espécie, uma com características patogénicas, no caso da presente nas plantas infetadas, e de uma estirpe da mesma espécie sem características de patogenicidade, a presente nas plantas assintomáticas, uma vez que, segundo Validov *et al.* (2011) ambas as estirpes são capazes de colonizar as raízes das plantas; 2) ou estamos perante uma associação de fungos que em consórcio ou separadamente têm uma ação antagonista e impedem a manifestação de patogenicidade por parte da estirpe que se encontra a colonizar plantas assintomáticas (Thakkar e Saraf, 2015). Para além desta espécie que se encontrava presente no solo foram ainda detetadas nas folhas as espécies *F. avenaceum*, que foi descrito como causador de necroses nas raízes e ramos, descoloração dos feixes do floema e dessecação e morte de amendoeiras (Chehri *et al.*, 2010) e *F. flocciferum*, que foi referido como provocando sintomas de podridão radicular e declínio da árvore em lenhosas perenes por Miao *et al.* (2015).

Para além dos fungos patogénicos do género *Fusarium*, os tecidos vegetais testados das plantas do local A encontravam-se claramente mais colonizados por fungos do que os do local B. No local A, observou-se que tanto a quantidade como a diversidade de fungos, 718 isolados pertencentes a 47 espécies diferentes, era maior que a encontrada no local B, 691 isolados pertencentes a 20 espécies diferentes. Tendo em conta que as plantas instaladas num e noutro local tinham a mesma idade e tiveram origem no mesmo viveiro em que são utilizadas as mesmas plantas mãe, os mesmos porta-enxertos e provavelmente também o mesmo substrato, pode-se sugerir que a diversidade de microrganismos presentes pode ter origem no solo em que foram instaladas. Os solos das duas parcelas não diferem muito em termos da sua constituição, uma vez que ambos são Pgm, no entanto o solo do local B esta em fase delgada, o que indica um solo com uma profundidade baixa no total dos seus horizontes (Cardoso 1965), tendo uma espessura mais fina e, portanto, uma menor camada arável que os solos do local A.

Os fungos isolados das plantas de ambas as parcelas foram agrupados por géneros, tendo-se verificado que os géneros que apareciam em maior percentagem nas plantas de cada local eram exatamente os mesmos embora com percentagens ligeiramente diferentes, esses géneros foram; *Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Sabe-se que existe uma elevada especificidade entre a planta

hospedeira e o microbioma, patogénico ou saprófita, que a coloniza, esta relação hospedeiro/fungo é modulada por duas vias; uma que está relacionada com as proteínas secretadas pelos fungos e que são reconhecidas pelo hospedeiro, e outra via, que está relacionada com a expressão génica típica da planta hospedeira (Aguilar-Trigueros e Rillig, 2016; Borah *et al.*, 2018).

A deteção do fungo fitopatogénico *Macrophomina phaseolina*, tanto em raízes de plantas sintomáticas da cultivar *Lauranne Avijor*, no local A como em raízes assintomáticas da mesma cultivar no local B, pode sugerir que este fungo poderia encontrar-se no substrato dessa cultivar ou no solo onde foram instaladas essas plantas. Este fungo pertencente à família *Botryosphaeriaceae* é um importante fungo fitopatogénico presente no solo e com uma larga gama de hospedeiros. Este fungo começa por colonizar as raízes das plantas que infeta, estendendo-se posteriormente ao caule e causando doenças do lenho numa grande variedade de plantas, sendo uma das sintomatologias descritas a presença de gomoses (Sarr *et al.*, 2014). A presença deste fungo pode estar relacionada com alguns dos sintomas detetados nas plantas doentes, pois ele causa bloqueio da passagem de água e nutrientes e consequentes sintomas de cloroses e murchidão das folhas das plantas afetadas. A não existência de sintomas visíveis nas plantas da mesma cultivar em que o fungo também estava presente pode ter a ver com a quantidade de inóculo presente ser menor, o fungo ainda estar pouco desenvolvido na planta hospedeira ou o microbioma dessa planta a estar a proteger.

A identificação de três espécies do género *Alternaria*, como *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. tenuissima* nos tecidos vegetais, veio confirmar que as mesmas espécies podem ter características de patogénico ou saprófita consoante o estado sanitário em que a planta hospedeira se encontra (Bart, 2003). Até ao momento, não são conhecidas referências que atribuam a *Alternaria* spp. sintomatologia sugestiva de doença em amendoeira. No entanto, com este trabalho, pode-se afirmar que se isolou *Alternaria* spp. de folhas de plantas que apresentavam sintomatologia idêntica à causada por *Alternaria alternata* em folhas de pessegueiro (Inoue e Nasu, 2000).

Pela análise estatística efetuada a cada uma das cultivares em estudo, e em cada um dos locais, A e B, relativamente à abundância de fungos isolados de plantas sintomáticas e assintomáticas, não se observaram diferenças significativas, o que pode significar que as plantas sintomáticas poderão apresentar, apesar de um idêntico número

de fungos, uma maior quantidade de inoculo do fungo causador da sintomatologia observada no campo que as assintomáticas. Esta carga de inóculo é preponderante para a manifestação de sintomas e expressão das doenças em plantas. Na verdade, sabe-se que o intervalo de tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas visíveis nas plantas pode estar dependente de vários fatores tais como; condições ambientais, estado da planta e progresso da produção de inóculo por parte do agente patogénico (APS 2018).

As diferenças relativamente à abundância de fungos endofíticos obtidos dos diferentes órgãos vegetativos, da cultivar *Lauranne Avijor* sintomática, no local A, revelaram-se significativas entre o número de fungos obtidos nas raízes, troncos e folhas, mostrando-se nestas últimas bastante maior que nas raízes e troncos. Isto vem corroborar a sintomatologia observada no campo, em que a parte aérea destas plantas se encontravam completamente morta. Estes tecidos mortos são muitas vezes colonizados por fungos saprófitas que existem no meio ambiente, indo assim aumentar o número de isolados presentes no material testado. Para além disto, sabe-se que as plantas quando infetadas expressam uma redução das suas defesas químicas nas folhas para se auto-protegerem do ataque dos agentes patogénicos, permitindo a entrada de saprófitas (González-Teuber *et al.*, 2014). As plantas assintomáticas da mesma cultivar não apresentaram diferenças significativas entre o número de isolados dos diferentes órgãos vegetais, mostrando as folhas como tendo menor incidência de fungos endofíticos, o que se justifica pelo estado ainda verde e aparentemente saudável da parte aérea. No local A, as amendoeiras da cultivar *Soleta* com sintomas de doença não apresentaram diferenças significativas entre a abundância de fungos isolados dos vários órgãos vegetais testados, o que é indicativo da igual dispersão homogeneia de fungos e, portanto, o aparecimento de sintomas associados a sua presença. As plantas assintomáticas, apresentaram diferenças significativas na abundância de fungos entre as raízes, troncos e folhas, sendo que as primeiras com um número maior de fungos que a parte aérea. Os valores obtidos podem significar que as plantas assintomáticas, a curto prazo, poderão mostrar sintomas de doença, devido à quantidade de fungos que se encontra já presente no seu sistema radicular. Este sistema, como já foi referido, é a zona de entrada de muitos fungos do solo, que após se instalarem nas raízes, começam a desenvolver-se e a colonizar a parte aérea da planta.

As plantas sintomáticas e assintomáticas do local B, tanto da cultivar *Lauranne*

Avijor como da cultivar *Soleta*, quando analisadas estatisticamente em termos de abundância de fungos endofíticos nos seus vários órgãos, mostraram diferenças significativas entre a colonização das diferentes partes vegetativas testadas. No caso da cultivar *Lauranne Avijor* sintomáticas e assintomáticas a colonização das raízes foi sempre superior à apresentada na parte aérea, sendo que as plantas sintomáticas apresentavam uma maior quantidade de isolados por órgão vegetal. As plantas da cultivar *Soleta* sintomáticas, mostraram um valor ligeiramente superior de fungos endofíticos isolados do tronco em comparação com as raízes, e ambos superiores aos valores encontrados para as folhas. Nas plantas assintomáticas desta cultivar os valores de colonização são aproximados nas raízes e no tronco, mas superiores às das folhas. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Aguilar-Trigueros e Rillig (2016), que referem que cada planta responde diferencialmente à infecção, resultando em diferentes padrões da comunidade microbiota apresentada nos seus tecidos.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Com o presente trabalho, verificou-se que existia um problema fitossanitário grave nas jovens plantas de amendoeira, pois foram identificados vários fungos fitopatogênicos nos diferentes órgãos testados, raízes, troncos e folhas. Esses agentes causadores de doença, agruparam-se sobretudo nos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*. Dentro do gênero *Fusarium* as espécies mais prevalentes foram: *F. oxysporum*, *F. equiseti* e *F. chlamydosporum*, espécies estas também detetadas no solo e na água de rega, levando a pensar que as fontes de inóculo poderiam estar nestes dois fatores de produção. Foram ainda detetadas nas plantas, outras espécies de *Fusarium*, como *F. avenaceum* e *F. flocciferum*, podendo a sua origem estar no material de viveiro. Dentro do gênero *Alternaria*, foram identificadas as espécies *A. alternata*, *A. infectoria* e *A. tenuissima*, todas estas espécies de *Alternaria* têm características de patogenicidade ou de saprófitas consoante as condições da planta hospedeira. No entanto, foram descritos sintomas semelhantes aos encontrados nas amendoeiras testadas neste trabalho, aos quais foi atribuído infecção por estas espécies, sendo, portanto, de considerar a possibilidade de estarem associadas aos sintomas nas plantas de amendoeira. Para além das espécies de *Alternaria* e *Fusarium* referidas, foi ainda encontrada a espécie fitopatogénica *Macrophomina phaseolina*, esta espécie poderá estar entre as espécies causadoras da sintomatologia observada, uma vez que está descrita como causadora de doenças no lenho de espécies arbóreas e arbustivas, que quando infetadas apresentam sintomatologia idêntica à observada nas amendoeiras em estudo neste trabalho.

Para além das espécies fitopatogénicas mais preponderantemente encontradas, foram detetadas várias espécies de fungos com características de antagonistas biológicos, como foi o caso de *Byssochlamys spectabilis* e *Epicoccum nigrum*. Devido à jovem idade das amendoeiras testadas e ao elevado número de espécies diferentes de fungos presentes nos seus órgãos vegetativos, não se conseguiu concluir se estes antagonistas poderiam ou não ter um papel protetor nas plantas. Concluiu-se então que cada planta responde com um bioma diferente às condições a que é sujeita, seja a condições ambientais ou sanitárias.

Este trabalho veio trazer nova informação acerca das doenças do amendoal e dos principais fungos que colonizam estas plantas, o que se revelou de extrema importância para a abordagem agronómica desta nova cultura que está a ocupar uma área crescente, não só em Portugal como também noutros países do mundo. No entanto, deixa em aberto várias questões que seguramente abrem novas linhas de estudo, tais como:

- A realização de ensaios *in vivo*, com jovens plantas de amendoeira isentas de doença, para realizar os Postulados de Koch e confirmar se alguns dos fungos fitopatogénicos isolados neste estudo estão relacionados com os sintomas observados;

- Realização de testes laboratoriais para testar a capacidade antagonista de alguns dos fungos obtidos e que já foram descritos anteriormente como tendo essas propriedades;

- Desenvolvimento de testes baseados em PCR quantitativo, para os principais organismos fitopatogénicos encontrados, de modo a conhecer a quantidade de inoculo nas plantas testadas, o que pode ter grande importância na definição da ocorrência da doença;

- Desenvolvimento de um teste de diagnóstico molecular para os principais fungos fitopatogénicos encontrados e que pudesse ser posteriormente disponibilizado aos viveiristas, de modo a que a produção de planta fosse cada vez mais isenta de doenças que possam vir a comprometer o seu desempenho agronómico no campo.

7. Referências

Abdallah, A., Ahumada, M. H., & Gradziel, T. M. (1998). Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. *Journal of American Society Horticulture Science*, 123, 1029–1033. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/123/6/1029.short>

Afifi, A. F. (1977). Fusarium wilt of *Prunus armeniaca* seedlings. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, Landwirtschaftliche Und Technische Mikrobiologie*, 132(2), 184–188. [https://doi.org/10.1016/S0044-4057\(77\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0044-4057(77)80061-0)

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*, fifth edition (Fifth Edit, Vol. 1). Dana Dreibelbis. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Aguilar-Trigueros, C. A., & Rillig, M. C. (2016). Effect of different root endophytic fungi on plant community structure in experimental microcosms. *Ecology and Evolution*, 6(22), 8149–8158. <https://doi.org/10.1002/ece3.2416>

Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>

Anderson, M.J., Gorley, R.N., Clarke, K.R., 2008. PERMANOVA Ap for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E, Plymouth, UK.

Borah, N., Albarouki, E., & Schirawski, J. (2018). Comparative methods for molecular determination of host-specificity factors in plant-pathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030863>

Bubici, G., D'Amico, M., & Cirulli, M. (2010). Field reactions of plum cultivars to the shot-hole disease in southern Italy. *Crop Protection*, 29(12), 1396–1400. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.07.021>

Chehri, K., Salleh, B., Soleimani, M. J., Reddy, K. R. N., & Zakaria, L. (2010). Occurrence of *Fusarium* spp. associated with root tissues and rhizosphere soils of forest trees and assessment of their pathogenicity on *Prunus amygdalus* seedlings. *Australian Journal of Botany*, 58(8), 679–686. <https://doi.org/10.1071/BT10140>

Clarke, K., Green, R., 1988. Statistical design and analysis for a biological effects study. Marine Ecology Progress Series 46, 213-226.

Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. Changes in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation, Second edition ed.

Climate-Data. (2018). Clima em Portalegre - Tempo, Dados climatológicos e Temperatura Portalegre. Retrieved July 10, 2018, from file:///C:/Users/Cláudio/Desktop/Clima em Portalegre_ Tempo, Dados climatológicos e Temperatura Portalegre - Climate-Data.org.html

Climate-Data. (2018). Clima em Évora- Tempo, Dados climatológicos e Temperatura Évora. Retrieved July 10, 2018, from file:///C:/Users/Cláudio/Desktop/Clima em Évora_ Tempo, Dados climatológicos e Temperatura Évora - Climate-Data.org.html

Costa, A. C. L. (2012). Influência De Dois Tipos De Cobertura Do Solo Na Produtividade E Na Fitossanidade Do Morangueiro. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Retrieved from <http://www.cothn.pt/publicfiles/zcqhzzudtayacj6eaz2ij5aezxp6kvu7dddea4rn.pdf>

Damm, U., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of Prunus species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99(5), 664–680. <https://doi.org/10.3852/mycologia.99.5.664>

DGADR. (2018). Nota explicativa da carta dos solos de Portugal e da carta de capacidade de uso do solo. Retrieved July 10, 2018, from file:///C:/Users/Cláudio/Desktop/Nota Explicativa da Carta dos Solos de Portugal e da Carta de Capacidade de Uso do Solo.html

Domingos, A. (2006). Manual de culturas, Hortícolas, volume I (3a edição). Lisboa: Editorial Presença.

Doyle J, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11e15.

ESRI 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems

Research Institute.

Giosuè, S., Spada, G., Rossi, V., Carli, G., & Ponti, I. (2000). Forecasting infections of the leaf curl disease on peaches caused by *Taphrina deformans*. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 563–571. <https://doi.org/10.1023/A:1008778814623>

Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., ... Armengol, J. (2012). Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 28, 1–13. <https://doi.org/10.3767/003158512X626155>

Grove, G. G. (2002). Influence of temperature and wetness period on infection of cherry and peach foliage by *Wilsonomyces carpophilus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(1), 40–45. <https://doi.org/10.1080/07060660109506969>

Gure, A., Slippers, B., & Stenlid, J. (2005). Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. *Mycological Research*, 109(9), 1005–1014. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003266>

Hartill, W. F. T., & Broadhurst, P. G. (1989). *Fusarium avenaceum* as a pathogen of stonefruit in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 17(3), 293–295. <https://doi.org/10.1080/01140671.1989.10428046>

INOUE, K., & NASU, H. (2000). Black Spot of Peach Caused by *Alternaria alternata* (Fr.). *Journal of General Plant Pathology*, 66, 18–22.

Instituto Nacional de Estatística, I. P. (2016). *Estatísticas Agrícolas 2016*. (I. P. Instituto Nacional de Estatística, Ed.). Lisboa, Portugal.

Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2018). Normais Climatológicas - 1971-2000 - Évora. Retrieved July 10, 2018, from file:///C:/Users/Cláudio/Desktop/IPMA - 007.html

Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2018). Normais Climatológicas - 1971-2000 - Portalegre. Retrieved July 10, 2018, from file:///C:/Users/Cláudio/Desktop/IPMA - 015.html

Kester, Dale E.; Gradziel, Thomas M.; Grassely, C. (1991). Almonds (prunus).pdf. In J. R. Eds, Moore; J.N. and Ballington (Ed.), Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops 2 (pp. 701–758). Wageningen, The Netherlands: International Society for Horticultural Science.

Lu, Y., Chen, C., Chen, H., Zhang, J., & Chen, W. (2012). Isolation and identification of endophytic fungi from *Actinidia macrocarpa* and investigation of their bioactivities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/382742>

M.K, V. (2015). Almond Production Technology. In A. S. SK Singh, AD Munshi, KV Prasad (Ed.), Training manual on teaching of post-graduate courses in horticulture (Fruit Science) (1st ed., pp. 274–280). Post Graduate School, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.

Madrigal, C., Tadeo, J. L., & Melgarejo, P. (1991). Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. *Mycological Research*, 95(12), 1375–1381. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80388-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80388-2)

Marek, S. M., Yagmour, M. A., & Bostock, R. M. (2013). *Fusarium* spp., *Cylindrocarpum* spp., and Environmental Stress in the Etiology of a Canker Disease of Cold-Stored Fruit and Nut Tree Seedlings in California. *Plant Disease*, 97(2), 259–270. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0355-RE>

McMichael, A. P., Robinson, S., & Services, H. (n.d.). All About Almonds Fact Sheet 07 – Almond Bud Initiation and Development, 1–10.

Miao, C.-P., Qiao, X.-G., Zheng, Y.-K., Chen, Y.-W., & Xu, L.-H. (2015). First Report of *Fusarium flocciferum* Causing Root Rot of Sanqi (*Panax notoginseng*) in Yunnan, China. *Plant Disease*, 99(11), 1650. Retrieved from [10.1094/PDIS-11-14-1168-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1168-PDN)

Micke, W. C. (1996). Almond Production Manual. (U. of C. Division of Agriculture and Natural Resources, Ed.). Publication 3364. Retrieved from https://books.google.pt/books?id=3dN5Yw_y8UEC&pg=PP3&lpg=PP1&focus=viewpo

rt&hl=pt-PT&output=html_text

MITRE jr., I., TRIPON, A., MITRE, I., & MITRE, V. (2015). The Response of Several Plum Cultivars to Natural Infection with *Monilinia laxa*, *Polystigma rubrum* and *Stigmina carpophila*; *Notulae Scientia Biologicae*, 7(1), 136–139. <https://doi.org/10.15835/nsb.7.1.9555>

Moreira, L. M., May-De Mio, L. L., & Valdebenito-Sanhueza, R. M. (2008). Fungos antagonistas e efeito de produtos químicos no controle da podridão parda em pomar de pessegueiro. *Summa Phytopathologica*, 34(3), 272–276. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000300016>

Neda, H., Halász, K., Pósa, T., Péter, G., Hrotkó, K., Gáspár, L., & Lukács, N. (2011). Diversity of endophytic fungi isolated from cherry (*Prunus avium*), 15(2), 1–6.

O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103–116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>

Oliveira, I. (2011). *Sobre – Cursos Técnicas de Regadio (2a edição)*. Lisboa.

Patel, C., Yadav, S., Rahi, S., & Dave, A. (2013). Studies on Biodiversity of Fungal Endophytes of Indigenous Monocotaceous and Dicotaceous Plants and Evaluation of their Enzymatic Potentialities. *International Journal of Scientific and Reserch Publication*, 3(7), 1–5.

Penrose, L. J. (1990). *Podosphaera tridactyla* : cleistothecial state of plum powdery mildew found in New South Wales. *Australasian Plant Pathology*, 19(3), 68–70. <https://doi.org/10.1071/APP9900068>

Pereira, L. S. (2004). *Necessidades de Água e Métodos de Rega*. Euroagro. Lisboa: Publicações Europa-América.

PIMENTA, R. S., MOREIRA da SILVA, J. F., BUYER, J. S., & JANISIEWICZ, W. J. (2012). Endophytic Fungi from Plums (*Prunus domestica*) and Their Antifungal Activity against *Monilinia fructicola*. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1883–1889.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-156>

Pimenta, R., Silva, J. da, Buyer, J., & Janisiewicz, W. (2012). Endophytic fungi from plums (*Prunus domestica*) and their antifungal activity against *Monilinia fructicola*. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1883–1889. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-156>

Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., ... Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 266(1–2), 5–43. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0539-9>

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013002738>

Rodrigo, S., Santamaria, O., Halecker, S., Lledó, S., & Stadler, M. (2017). Antagonism between *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*) and plant pathogens: Involvement of the bioactive compounds produced by the endophyte. *Annals of Applied Biology*, 171(3). <https://doi.org/10.1111/aab.12388>

Rodriguez, R., & Redman, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1109–1114. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm342>

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., & Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9(6), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.04.005>

SARR, M. P., NDIAYE, M., GROENEWALD, J. Z., & CROUS, P. W. (2014). Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2), 250–268. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>

Schardl, C., & An, Z. (1993). Molecular Biology and Genetics of Protective Fungal Endophytes of Grasses. In J. K. Setlow (Ed.), *Genetic Engineering* (Vol. 15, pp. 191–212). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1666-2_9

Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? In *Microbial Root Endophytes* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9>

Schulze-Menz G. K. (1964) Rosaceae. In: Melchior H. (ed.) *Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien II*. 12th ed. Gebru" der Borntraeger, Berlin, pp.209–218

SEIDLE, A. J. (2013). Etiology, Epidemiology, and Management of *Fusarium* spp. Causing Cryptic Cankers in Cold-stored, Bare-Root Propagated Almond Trees in California Nurseries. University of California.

Selosse, M. A., Baudoin, E., & Vandenkoornhuyse, P. (2004). Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus - Biologies*, 327(7), 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2003.12.008>

Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L., & Lupo, S. (2016). Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 146(3), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0936-4>

Shaw, A. D., Adaskaveg, J. E., & Ogawa, J. M. (1990). Influence of Wetness Period and Temperature on Infection and Development of Shot-Hole Disease of Almond Caused by *Wilsonomyces carpophilus*. *Phytopathology (USA)*, 80(8), 749–756.

Stępniewska, Z., & Ku"niar, A. (2013). Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9589–9596. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5235-9>

STRAND, L., & OHLENDORF, B. (2002). *Integrated Pest Management for Almonds* (2nd ed.). Division of Agriculture and Natural Resources University of California.

Sumner, D. A., Matthews, W. A., Medellín-Azuara, J., & Bradley, A. (2014). *The Economic Impacts of the California Almond Industry A Report Prepared for the Almond Board of California. The Economic Impacts of the California Almond Industry A Report Prepared for the Almond Board of California Daniel* (Vol. 1). Retrieved from [http://aic.ucdavis.edu/almonds/Economic Impacts of California Almond Industry_Full Report_FinalPDF_v2.pdf](http://aic.ucdavis.edu/almonds/Economic%20Impacts%20of%20California%20Almond%20Industry_Full%20Report_FinalPDF_v2.pdf)

Syrop, M., & BECKETT, A. (1976). Leaf curl disease of almond caused by *Taphrina deformans*. III. Ultrastructural cytology of the pathogen. *Canadian Journal of Botany*, 54(3–4), 293–305. Retrieved from 10.1139/b76-027

Tavares, S., Inácio, J., Fonseca, A., & Oliveira, C. (2004). Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 973–982.

Thakkar, A., & Saraf, M. (2015). Development of microbial consortia as a biocontrol agent for effective management of fungal diseases in *Glycine max* L. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(6), 459–474. <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.893638>

The American Phytopathological Society. (2018). Plant Disease Epidemiology: Temporal Aspects. Retrieved September 29, 2018, from <https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/EpidemiologyTemporal/Pages/MathematicalModels.aspx>

Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225–236.

Torres, J.M.O.; dela Cruz, T. E. . (2015). Antibacterial activities of fungal endophytes associated with the Philippine endemic tree, *Canarium ovatum*. *Mycosphere*, 6(3), 266–273. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/3/4>

Traquair, J. A., & White, G. P. (1992). *Cylindrocarpum* rot of fruit trees in cold storage. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14(4), 310–314. <https://doi.org/10.1080/07060669209500869>

Úrbez-Torres, J. R., Boulé, J., Haag, P., Hampson, C., & O’Gorman, D. T. (2016). First Report of Root and Crown Rot Caused by *Fusarium oxysporum* on Sweet Cherry (*Prunus avium*) in British Columbia. *Plant Disease*, 100(4), 855. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0932-PDN>

Validov, S. Z., Kamilova, F. D., & Lugtenberg, B. J. J. (2011). Monitoring of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains during tomato plant infection. *Microbial*

Biotechnology, 4(1), 82–88. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00214.x>

van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(SUPPL. 1), 43–54. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1031>

Varanda, C. M. R., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M. I. E., & Félix, M. do R. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, 120(12), 1525–1536. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.002>

Wang, F., Zhao, L., Li, G., Huang, J., & Hsiang, T. (2011). Identification and Characterization of *Botryosphaeria* spp. Causing Gummosis of Peach Trees in Hubei Province, Central China. *Plant Disease*, 95(11), 1378–1384. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0893>

Weaver, D. J. (1979). Role of conidia of *Botryosphaeria dothidea* in the natural spread of peach tree gummosis. *Phytopathology*, 69(4), 330–334. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-330>

Weaver, D. J. (1974). A Gummosis Disease of Peach Trees Caused by *Botryosphaeria dothidea*. In *Phytopathology* (Vol. 64, pp. 1429–1432). <https://doi.org/10.1094/Phyto-64-1429>

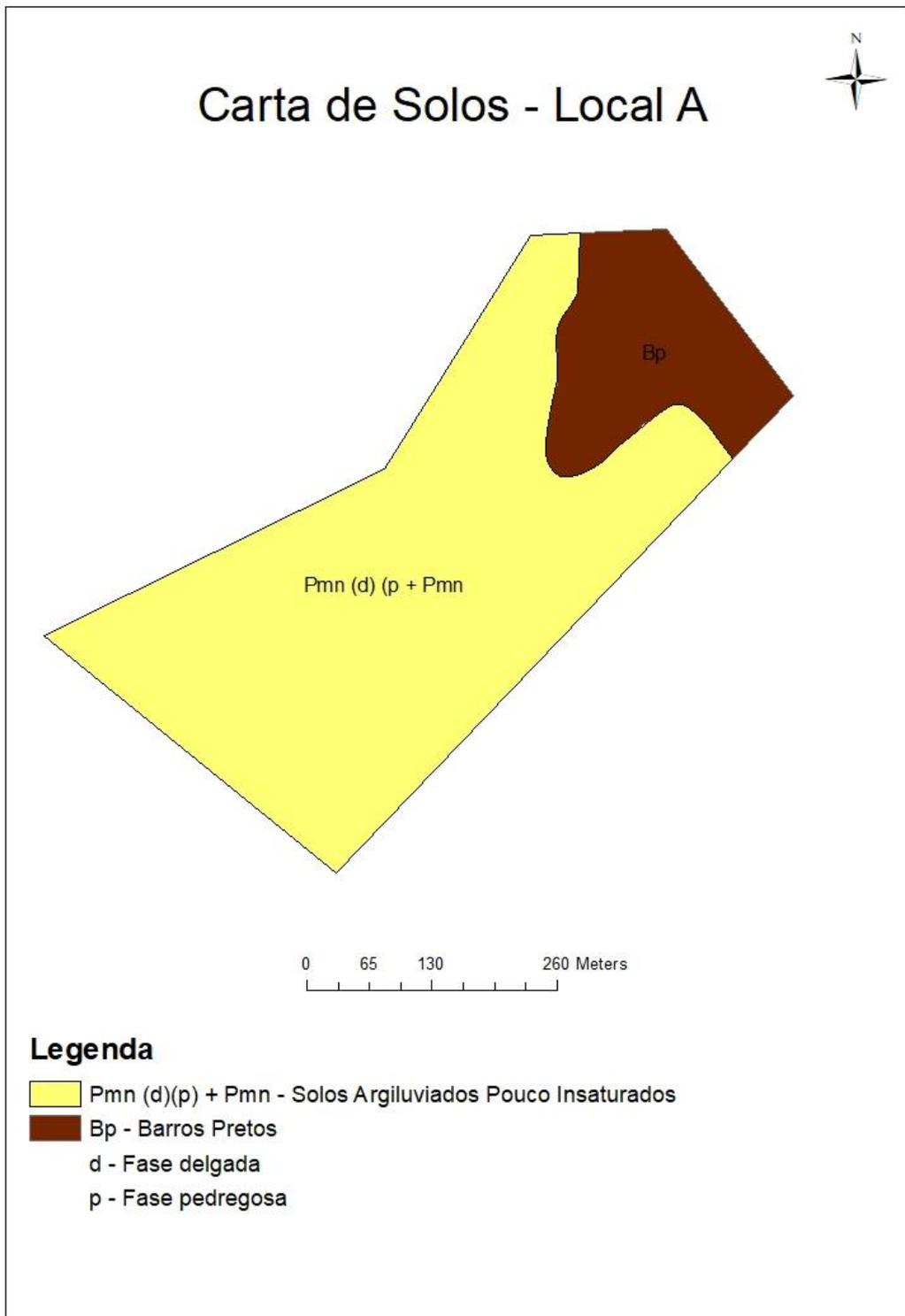
White T, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc, New York, pp. 315e322.

Yousefi, A., & Shahri, M. H. (2014). Shot hole disease , survival and pathogenicity of the causal agent on stone fruit trees in Northeast Iran. *Journal of Crop Protection*, 3(4), 563–571.

Zuccaro, A., Lahrmann, U., & Langen, G. (2014). Broad compatibility in fungal root symbioses. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.013>

8. Anexos

Anexo I – Carta da Solos do Local A



Anexo II – Carta de Solos do Local B

