
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A
FOLHAS DE OLIVEIRAS E SUA RELAÇÃO ANTI-HERBIVORIA POR
FORMIGAS-CORTADEIRAS**

AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA



DEZEMBRO - 2020



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A
FOLHAS DE OLIVEIRAS E SUA RELAÇÃO ANTI-HERBIVORIA POR
FORMIGAS-CORTADEIRAS**

AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Profº. Dr. Odair Correa Bueno
Co-orientador: Profº. Dr. Ricardo Harakava

**RIO CLARO – SP
2020**

O48d

Oliveira, Amanda Aparecida de

Diversidade de microrganismos endofíticos associados a folhas de oliveiras e sua relação anti-herbivoria por formigas-cortadeiras / Amanda Aparecida de Oliveira. -- Rio Claro, 2020

86 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Odair Correa Bueno

Coorientador: Ricardo Harakava

1. Endofíticos. 2. Microrganismos. 3. Formigas-cortadeiras. 4. Diversidade. 5. Oliveiras. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A FOLHAS DE OLIVEIRAS E SUA RELAÇÃO ANTI-HERBIVORIA POR FORMIGAS-CORTADEIRAS

AUTORA: AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ODAIR CORREA BUENO

COORIENTADOR: RICARDO HARAKAVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO (Participação Virtual)
CEIS / IB Rio Claro

Profa. Dra. WEILAN GOMES DA PAIXÃO MELO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Profa. Dra. CÍNTIA MARTINS PERINOTTO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Profa. Dra. JOSIANE BARROS CHIARAMONTE (Participação Virtual)
Pesquisa e Desenvolvimento - Bioprospecção / Vittia Fertilizantes e Biológicos S.A.

Prof. Dr. TÁSSIO BRITO DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
x / Pós-Doutorando da USP - Ribeirão Preto

Rio Claro, 03 de dezembro de 2020

Dedico esse trabalho ao meu pai José de Oliveira (*in memorian*),
minha avó Cacilda (*in memorian*) e a minha amada mãe Salete
por todo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES) – pela concessão da bolsa possibilitando o desenvolvimento desse projeto de pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao prof. Odair Correa Bueno que sempre forneceu suporte e condições para desenvolvimento dessa pesquisa incluindo financiamento de técnicas mais modernas de sequenciamento, por todo seu ensinamento, seu exemplo profissional e pessoal também. Todas as discussões, conversas, cafés e experiências trocadas me sinto muito lisonjeada e grata por fazer parte de um time seletivo como esse. Quem me recebeu em Rio Claro proporcionando e incentivando a pesquisar, conversar, aprender, ensinar, e claro por sempre acreditar em mim dizendo “Calma menina”, seus ensinamentos levarei para vida.

Ao meu coorientador prof. Ricardo Harakava que sempre participou ativamente do projeto, incentivando a pesquisar novas abordagens, realizando questionamentos e buscando maneiras de explorar o senso crítico. Pela confiança e oportunidades nessa nova etapa da minha vida. Sou muito grata pela confiança e amizade de tanto tempo.

À Ana Eugênia de Carvalho Campos por me apresentar o Projeto Oliva SP, instigar a curiosidade e propor participar desse desafio. Eu a tenho como inspiração, ela sempre sugerindo sair da zona de conforto e explorar as belezas que a vida possa nos proporcionar.

À Dra. Corrie Saux Moreau por me receber durante o período de Doutorado Sanduíche na Cornell University. Não tenho palavras para agradecer toda confiança, paciência e condições fornecidas durante esse período. Um exemplo de pesquisadora, professora e ser humano fantástico no qual tive prazer de trabalhar e conviver.

À Dra. Edna Bertoncini pesquisadora da Agência Paulista de Tecnologias do Agronegócio – APTA, uma pessoa primordial para esse trabalho e minha amiga. Por apresentar e despertar uma paixão pelas olivas e além de contribuir na aquisição de todas as amostras desse projeto. Ela possibilitou conhecer de perto dificuldades e desafios da olivicultura paulista e sempre incentivar que a ciência não pode ficar somente na academia.

Aos produtores paulistas e mineiros que me receberam de portas e portei ras abertas, nos fornecendo amostras para a condução dessa pesquisa e sempre muito gentis. Sem vocês esse trabalho certamente não seria possível, o meu muito obrigada.

À Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Câmpus Rio Claro e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais - C.E.I.S onde me acolheram e ensinaram muito ao longo dessa caminhada.

Ao Instituto Biológico de São Paulo onde iniciei minha trajetória acadêmica e tenho não somente colaboradores e sim amigos que adquiri durante todo esse período.

À Unidade Laboratorial Referência em Biologia Molecular Aplicada do Instituto Biológico – SP e todos que contribuíram para minha formação, aprendizado e desenvolvimento desse projeto. Aos pesquisadores e amigos Carolina Marchi, Alexander Banguela, Pedro Ramos, Camila Chabi, Carlos Albuquerque, Samuel La Marck, Marianne Rodrigues, Matheus Postclam, Uiara Souza, Gustavo Santos e Patricia Haddad.

Ao Laboratório de Formigas-Cortadeiras – LAFC da UNESP, por todos que de alguma maneira com dicas, conversas, discussões, reuniões, confraternizações contribuíram para melhoria desse trabalho, sem dúvida vocês foram primordiais. Agradeço por todos amigos que ganhei quando me mudei para Rio Claro se transformando uma extensão da família Alex Viera, Amanda Carlos, Ana Claudia Marcato, Bianca Nogueira, Cintia Marins, Daiane Polezel, Mayara Pereira, José Henrique Pezzonia, Manuela Leal, Nathalia Almeida, Syndel, Thaís Marchesin, Thays Neigri, Larissa, Tatiane Domingues, Jani Pereira, Silvana Beani, Laura Machado e Manu Ramalho.

Aos meus amigos do C.E.I.S Adna, Tatiane, Lucas, Pâmela, Caio, Corina, Renata, Milene, Iago, Bibiana e todos que auxiliariam de alguma maneira.

À Necis Miranda por toda ajuda em todos os processos do curso sempre eficiente, prestativa e uma doçura de pessoa.

Aos membros do Moreau Lab da Cornell University Corrie Moreau, Anaïs Chanson, Christophe Duplais, Leland Graber, Zoe Kim, Megan Barkdull, Jaime Ortiz Pachar, Steven Wang, Jacob Gorneau, Peter Flynn, Benjamin Blanchard e Manu Ramalho por todas dicas, discussões e aprendizados durante minha estada em Ithaca.

Aos meus amigos de Ithaca, Nova Iorque: Daiana Souza, Rodrigo Santos, Samantha Fonseca, Rafael Almeida, Augusto Rampasso e aos piticos Heitor, Maria Luiza e Helena. Com eles a alegria, risadas e amizade garantida, obrigada por tornarem minha estada incrível em meio a uma pandemia, sei que isso é para poucos.

À família Ramalho-Sanches que incluí Manu Ramalho, Marcelo Sanches, as sobrinhas Nicky Formiguinha e Cacau. Meus amigos queridos foram ponto de apoio e parceiros para todas as horas. Graças a eles minha experiência fora do país foi fantástica, experiências gastronômicas, lugares lindos e claro por me apresentarem as boas cervejas estadunidenses. Agradeço a sorte de ter vocês em minha vida, obrigada por tanto.

À Manuela Ramalho por ter uma participação incrível nesse trabalho com dicas, sugestões e ensinamento sobre análises e claro ser um ser humano inspirador. Manu foi mentora, amiga, colaboradora tudo de uma única vez. Sabe quando você tem sorte de colaborar com uma amiga? Então é assim que me sinto, por toda força e incentivo, és uma admiração e exemplo para mim.

À Harumi Hojo por sempre incentivar e me apoiar nos caminhos escolhidos, por ter participado desse o início da minha vida acadêmica até os dias de hoje. Toda confiança e oportunidade fornecidas contribuiu para o caminho onde estou agora, obrigada de coração.

Aos membros da república que se tornaram amigos Mariana Cavalheiro, Laila Dias, André Renan, Raquel Quirino, Gabriela Manfrim, Murilo Zaine, Clarissa e as dogs mais pilantras Tequila e Melissa. Vocês tornaram a caminhada e saudades de casa mais leves, sem contar as comilanças é claro.

Às amigas Mayara Pereira, Daiane Polezel, Patricia Haddad, Ana Claudia Marcato, Bianca Nogueira e Silvana Beani por acompanhar todo processo de execução desse projeto, risadas, desabafos, alegrias e consolos quando algo não funcionava vocês tornaram essa experiência muito mais agradável e divertida com toda certeza. Todas são mulheres incríveis saibam que vocês me orgulham e me inspiram cada uma a sua forma.

Aos amigos Otávio Silva, Tae Fernandes e Jani Pereira que auxiliaram com discussões, conversas, correções, dicas e distrações meu muito obrigada.

Ao meu pai José de Oliveira (*in memorian*) que enquanto nesse plano sempre incentivou a estudar, apoiou de todas as maneiras para que o sonho se tornasse realidade. Sei que ele estará feliz por mais essa conquista.

À minha família que sempre me apoiou, forneceu suporte, incentivo e em momentos difíceis estavam lá, acreditando, animando dando força. Em especial duas pessoas que foram primordiais em minha vida a minha mãe Salete e minha avó Cacilda (*in memorian*), duas mulheres que são exemplos de força, garra e coragem.

À minha avó Cacilda Francisca (*in memoriam*), por todos ensinamentos, confiança, apoio. Ela sempre acreditou, torceu, rezou e incentivou a continuar a fazer o que gosto que é pesquisar e ser cientista.

À minha mãe Salete Silva por apoiar, confiar, dar todo suporte pessoal, conselhos, puxões de orelha e sempre regado de boas parcerias, sei que se cheguei até aqui foi também pelo seu apoio e admiração, saiba que a senhora é minha inspiração.

À minha madrinha Amélia e minha prima Amaynara por ajudarem, incentivar e nunca deixar desanimar, dando sempre bons conselhos e incentivos. Todos os cafés com bolos e pão caseiros.

Ao Márcio Martins meu namorado e companheiro, por sempre me ajudar, partilhar todas experiências e incentivar a continuar seguir meus sonhos. Por compartilhar diversas fases em minha vida sejam momentos de alegrias, tristezas, e tantos outros que foram importantes para nós, amo você.

A todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente, torcendo, conversando, dando ideias e apoiando eu agradeço vocês.

E a Deus por me permitir chegar nessa etapa de muito aprendizado e experiências vividas.

RESUMO

Nas últimas décadas no país, a olivicultura tem se expandido na região sudeste principalmente nos estados como São Paulo e Minas Gerais, desafios com insetos pragas como as formigas-cortadeiras têm se mostrado um obstáculo para o cultivo. A oliveira (*Olea europaea*) é uma planta originária da região Mediterrânea e tem se mostrado altamente atrativa ao corte por formigas-cortadeiras, essa que por sua vez têm origem nos neotrópicos. Em busca de métodos de controles alternativo para formigas-cortadeiras, pesquisas com microrganismos para esse uso têm ganhado destaques nos últimos anos. Os microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem dentro do tecido foliar sem causar danos aparentes ao hospedeiro. Pesquisas sobre abundância de endófitos mostrou que esse parâmetro além de idade e tenacidade da folha deveriam ser considerados sobre escolha de corte. Para a cultura da oliveira não se sabe se cultivares diferentes influenciariam na escolha do corte das formigas-cortadeiras. Os endofíticos podem desempenhar inúmeros benefícios às plantas hospedeiras como promoção de crescimento, resistência a estresse abióticos e proteção anti-herbivoria. Por isso, conhecer a diversidade de microrganismos endofíticos associados a folhas de oliveiras é um primeiro passo para compreensão dessa interação entre as formigas-cortadeiras e essa planta introduzida. Ferramentas moleculares são frequentemente utilizadas para conhecer diversidade de endofíticos combinando técnicas de isolamento e de sequenciamento de nova geração (NGS). Assim, os objetivos deste estudo foram identificar a diversidade de microrganismos endofíticos associados às folhas de oliveira com métodos dependente e independente de cultura, verificar quais fatores influenciam a composição e abundância dessa comunidade microbiana, realizar isolamento de fungos endofíticos, identificá-los molecularmente, identificar o modo trófico desses fungos pelo FunGuild e verificar a preferência de corte das formigas-cortadeiras entre as cultivares de oliveiras. Amostras de folhas foram coletadas de 93 plantas em nove localidades dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Uma parte foi utilizada para extrair diretamente o DNA e a outra para realizar o isolamento dos fungos. Para o sequenciamento *metabarcoding* pelo equipamento MiSeq (Illumina) foram utilizados primers para as regiões 16S rRNA para identificar bactérias e ITS para fungos. Para os fungos cultiváveis utilizou-se sequenciamento Sanger da região ITS. Os resultados revelaram que fatores como idade, altitude e geografia podem influenciar a comunidade microbiana, enquanto que a cultivar não influenciou. Para a comunidade bacteriana endofítica o fator que influenciou foi a localização geográfica e para a comunidade fúngica foram idade, altitude e localização. Foram obtidos cerca de 800 isolados, que foram agrupados em 191 morfotipos e identificados molecularmente, resultando em 38 gêneros, sendo 32 deles registrados pela primeira vez em oliveiras cultivadas no Brasil. Entre os fungos cultiváveis o nível trófico mais abundante foi o patotrófico. As cultivares não influenciaram no corte pelas formigas-cortadeiras. Outros estudos serão necessários para melhor compreender como esses herbívoros apresentam uma capacidade de desfolhar plantas não-nativas como as oliveiras. Os isolados fúngicos obtidos serão utilizados para novas abordagens em diferentes áreas do conhecimento como fitopatologia e controle de insetos.

Palavras-chaves:

Herbivoria. NGS. Fungos endofíticos. Bactérias endofíticas. Formigas-cortadeiras.

ABSTRACT

Brazil is the seventh-largest importer of olive oil and olives, in recent years olive growing has expanded in the southeast region of the country in states such as Sao Paulo and Minas Gerais precisely because it has excellent consume. However, there are some challenges in this culture and one of them is the insect pests such as leaf-cutter ants. The olive tree (*Olea europaea*) is a plant originating in the Mediterranean region that has been shown to be highly attractive to cutting by leaf-cutting ants, which originate in the Neotropics. Nowadays, the most efficient control method is toxic baits, but they are harmful to the environment and humans. Therefore, control alternatives are needed, in this line of research, microorganisms have gained prominence in recent years. Endophytic microorganisms are mainly fungi and bacteria that live inside the leaf tissue without causing apparent damage to the host. Research on endophyte abundance has shown that this parameter in addition to leaf age and tenacity should be considered on cut choice. For olive tree culture, it is not known if different cultivars would influence the choice by cutting ants. Endophytes can perform numerous benefits to host plants such as growth promotion, resistance to antibiotic stress, and anti-herbivory protection. Therefore, knowing the diversity of endophytic microorganisms associated with olive leaves is a first step in understanding the interaction between leaf-cutting ants and the introduced plant. Molecular approaches are often used to discover endophytic diversity combining isolation techniques and new generation sequencing (NGS). Thus, the objectives were to identify the diversity of endophytic microorganisms associated with olive leaves with culture dependent and independent methods, to verify which factors influence the composition and abundance of this microbial community, to isolate endophytic fungi, to identify them molecularly, to identify the trophic mode of these fungi by FunGuild and to test the cutting preference of ants between olive cultivars. Leaf samples were collected from 93 plants in nine locations in the states of São Paulo and Minas Gerais. The surfaces of the leaves were sterilized and one part was used to extract directly the DNA and the other to perform the isolation of the fungi. For the metabarcoding sequencing using Illumina MiSeq, primers for the 16S rRNA regions were used to identify bacteria and for the ITS region to identify fungi. Isolated fungi had their ITS region sequenced by the Sanger method. The results revealed that factors such as age, altitude, and geography could influence the microbial community, while cultivar was not influential. For the endophytic bacterial community, the most influential factor was geographic location and for the fungal community age, altitude, and location. About 800 isolates, were obtained, which were grouped into 191 morphotypes and identified molecularly resulting in 38 genera, 32 of which were registered for the first time in olive trees cultivated in Brazil. Among the cultivable fungi, the most abundant trophic level was the pathotrophic. Cultivars, had no influence on cutting by the cutting ants. Further studies will be needed to better understand how these herbivores can defoliate non-native plants like olive trees. The obtained fungal isolates will be used for new approaches in different areas of knowledge such as phytopathology and insect control.

Key-words

Herbivory. NGS. Endophytic fungi. Endophytic bacteria. Leaf-cutting ants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Oliveiras no mundo e no Brasil.....	12
2.2	Desafios da cultura no país	13
2.3	Estudos independentes de cultivo	16
3	OBJETIVOS	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Área de coleta	20
4.2	Desinfecção superficial das folhas	21
4.3	Extração de DNA das folhas	21
4.4	Construção das bibliotecas <i>Illumina Miseq 16S rRNA e ITS</i>	22
4.5	Análises de bioinformática.....	22
4.6	Análises estatísticas	23
4.7	Isolamento de fungos endofíticos	24
4.8	Extração de DNA a partir dos micélios	24
4.9	PCR e sequenciamento Sanger	25
4.10	Análises de bioinformática para os isolados fúngicos	25
4.11	Teste de preferência de corte das formigas-cortadeiras entre cultivares de oliveiras	26
5	RESULTADOS	28
	Artigo 1	28
	Artigo 2	58
5.	CONSIDERAÇÕES	73
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A cultura da oliveira (*Olea europaea* L.), ou olivicultura, é emergente no cenário agrícola brasileiro e paulista, podendo permitir aumento de renda em propriedades localizadas em regiões com clima propício à cultura, menor dependência de produtos importados e aumento da qualidade de azeites consumidos no país (BERTONCINI; TERRAMOTO, PRELA-PANTANO, 2010). A área paulista de produção de azeitona abrange mais de 15 municípios, contando com mais de 60.000 plantas de oliveiras, localizados em regiões serranas com altitudes variando de 1.000 metros a 2.798 metros, com microclima que proporciona horas de frio necessárias para o florescimento das plantas de oliveiras (BERTONCINI; TERRAMOTO; PRELA-PANTANO, 2010).

As pesquisas com olivicultura no Brasil ainda são incipientes e, tendo em vista o baixo nível de conhecimento tecnológico aplicado aos plantios, é de extrema importância que sejam realizados estudos dessa cultura no país para que se torne uma alternativa rentável aos agricultores brasileiros (PAULUS, 2011). Dentre os estudos de imediata importância destaca-se o conhecimento dos artrópodes que podem ocasionar danos às plantas. Diversas espécies de pragas são relatadas nos países produtores de oliveira olivicultura (COUTINHO *et al.*, 2009) de forma que, em casos extremos, podem ser consideradas como fatores limitantes ao seu cultivo (PATANITA; REIS, 2007).

Os artrópodes são considerados pragas importantes da olivicultura no Brasil e até mesmo limitantes na fase de implantação do pomar, dada à severidade dos ataques às plantas mais novas. São exemplos de pragas as formigas-cortadeiras, como saúvas (*Atta* sp.) e quenquéns (*Acromyrmex* sp.) (PRADO; SANTA-CECÍLIA; ALVARENGA, 2012), as quais causam desfolhamento parcial ou total das folhas de oliveira. Em casos graves de desfolha, podem causar a morte de plantas jovens (COUTINHO *et al.*, 2009) ou ocasionar a perda da produtividade. Vale salientar que, por serem espécies originárias da região neotropical, essas formigas não ocorrem nas regiões de origem das oliveiras, no Mediterrâneo (BESNARD; BERVILLÉ, 2000).

A maioria dos olivais localizados em território paulista e mineiro está sendo implantado em antigas áreas de pastagens e vizinhas a áreas de mata, o que torna ainda mais preocupante o ataque pelas formigas-cortadeiras, pois, muitas vezes, não há qualquer controle prévio dessa praga. Estudos de controle desses insetos são contínuos no Brasil e a busca por alternativas de proteção às plantas é sempre desejável (ZANETTI *et*

al., 2014). Neste contexto, os microrganismos endofíticos demonstram grande potencial para o controle de pragas.

Microrganismos endofíticos, principalmente os fungos e bactérias, têm atraído crescente atenção por parte dos pesquisadores, por possuírem propriedades importantes, como conferir resistência a seus hospedeiros em condições de estresse hídrico, produção de hormônios vegetais e outros compostos, tais como enzimas e fármacos de interesse biotecnológico (AZEVEDO *et al.*, 2000). A definição mais abrangente foi proposta por Azevedo *et al.*, (2007), que descreveram os endófitos como todos os microrganismos que podem ou não ser cultivados com sucesso, que são aptos a colonizar internamente a planta hospedeira e não causam danos aparentes e/ou estruturas externas visíveis.

No caso das bactérias, elas são consideradas endofíticas quando vivem dentro de uma planta por, pelo menos, uma parte da sua vida sem causar danos aparentes ao hospedeiro. Essas bactérias endofíticas podem ser isoladas a partir de tecidos ou extraídas a partir das plantas hospedeiras com superfície desinfetada (HALLMANN *et al.*, 1997) para identificação e, posterior, uso. É grande o potencial de aplicações práticas de endófitos, o que tem incentivado estudos abordando a capacidade das bactérias para controlar tanto doenças quanto infestações de insetos-praga, bem como promover o crescimento das plantas (AZEVEDO *et al.*, 2000; KOZDRÓR *et al.*, 2004; KAVINO *et al.*, 2007).

Outro grupo com capacidade de controlar insetos-praga são os fungos endofíticos, que colonizam o interior da planta hospedeira (WILSON, 1995), por aumentarem a resistência e tolerância do hospedeiro às doenças e pragas (OWNLEY *et al.*, 2010). Estudos visando isolamento de fungos endofíticos para o controle de insetos-praga têm se tornado frequente (VAN BAEL *et al.*, 2009). Esse tipo de defesa já foi descrito para plantas de clima temperado (WILSON; CARROLL, 1994; WILSON; FAETH, 2001), porém poucos estudos foram conduzidos em áreas tropicais, onde a diversidade de endofíticos é maior e a maioria das espécies de formigas-cortadeiras reside (VAN BAEL *et al.*, 2009).

Trabalhos sobre a preferência ao corte de formigas-cortadeiras conduzidos em laboratório demonstraram uma baixa taxa de forrageamento de folhas com alta taxa de fungos endofíticos, sugerindo que eles são antagonistas ao fungo simbiótico das formigas cortadeiras (BITTLESTON *et al.*, 2011). Também é possível que a rejeição ao corte de plantas com altas taxas de fungos endofíticos se deva aos efeitos desses

microrganismos nas propriedades físicas da planta hospedeira, como aumento na deposição de lignina nas células de cera (MEJÍA *et al.*, 2014), ou produção de compostos secundários (PETTIT, 2009), tornando a planta menos palatável à herbivoria (CLAY, 1990). O verdadeiro potencial desses microrganismos como agentes de controle biológico ainda precisa ser melhor elucidado (MARTINS *et al.*, 2014), principalmente em plantas de importância econômica.

Sobre a composição do microbioma das plantas, Whipps e colaboradores (2008) discutiram a importância de métodos independente-cultura para conhecimento da diversidade da filosfera (parte das plantas acima da superfície do solo) e de seus microrganismos associados. Rasche e colaboradores (2006) demonstraram que o perfil de comunidades de filosfera é impreciso quando baseadas em métodos dependentes de cultura (isolamento) e subestima sua real diversidade. Esse trabalho sugere que o uso de metodologias independentes da cultura possibilita o conhecimento da diversidade de comunidades muito maior do que a reconhecida, embora as suposições sobre os habitantes dominantes estejam amplamente corretas.

Atualmente, existem diversas técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) que podem ser úteis ao estudo dos endofíticos. O presente estudo objetiva revelar aspectos importantes sobre a comunidade e diversidade de microrganismos associados às folhas de oliveira e sua influência na escolha de corte das formigas cortadeiras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oliveiras no mundo e no Brasil

As oliveiras *Olea europaea* L., pertencente à família Oleaceae, são mundialmente conhecidas por produzirem frutos comestíveis denominados azeitonas (COUTINHO *et al.*, 2009). Plantas de porte arbóreo com um ciclo de vida perene e longo, elas tiveram origem na região da Bacia Mediterrânea (BESNARD; BERVILLÉ, 2000). Por ser uma planta de clima temperado com exigências de temperaturas baixas no período antes da floração (como pelo menos, 400 horas de frio abaixo de 12°C), requer conhecimentos sobre climas regionais e solos no intuito de identificar áreas aptas ao plantio no país (VILLA, 2012; WREGGE *et al.*, 2015).

O cultivo da olivicultura na América do Sul e Central iniciou-se no século XVI no Peru, Chile, Argentina e México, expandindo-se para América do Norte em estados como Califórnia, Carolina do Sul e Flórida a partir do século XVIII (VILLA, 2012; CIVANTOS, 2008). No Brasil, a cultura foi trazida pelos portugueses durante o período colonial para consumo próprio mas, posteriormente, a coroa portuguesa ordenou que as árvores fossem derrubadas devido à grande chance de conflito comercial (IBRAOLIVA, 2020; KIST; SANTOS; OLIVEIRA, 2018).

Segundo Villa, (2012), a olivicultura conseguiu um progresso notável em países do continente americano quando se refere à área de plantio. Diversos países apresentam uma área cultivada significativa, como a Argentina com 73 mil hectares, o Peru com 11 mil hectares, o Chile com 6 mil hectares e o México com cerca de 5 mil hectares. No Brasil, no início do século XIX, a cultura se estabeleceu com uma maior intensidade nas regiões Sul nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e na região Sudeste nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (COSTA; MELLONI, 2019; VIEIRA NETO *et al.*, 2008).

Nas últimas duas décadas, houve um aumento nas áreas cultivadas principalmente em cidades no estado do Rio Grande do Sul (RS) empregando variedades como Arbequina, Picual e Koroneiki (COUTINHO *et al.*, 2009; WREGGE *et al.*, 2015), mas estudos feitos na região sudeste do país demonstraram potenciais áreas para o cultivo de oliveiras (OLIVEIRA, 2012). Em referência ao mercado econômico, o Brasil é o sétimo país no ranking de maiores consumidores de azeite do mundo e o segundo maior importador (IOC, 2020). Para atender as demandas do mercado interno, o país ainda

importa azeitonas e azeite de oliva do exterior, como Espanha, Itália, Grécia, Portugal, e de países produtores sul-americanos como Argentina e Chile (BALLUS *et al.*, 2014). Em 2017, a safra nacional de azeitona foi de 1.200 toneladas e cerca de 130 mil litros de azeite de oliva (KIST; SANTOS; OLIVEIRA, 2018).

Embora o Brasil ainda não seja considerado com um dos grandes produtores de azeite, os olivicultores brasileiros buscam seu espaço comercial conquistando premiações anualmente em concursos internacionais sobre a qualidade de seus produtos (MIRAGAIA, 2019).

2.2 Desafios da cultura no país

Em 2009 foi criado o projeto “Oliva SP” composto por um grupo de pesquisadores multidisciplinares da Agência Paulista dos Agronegócios (APTA), Secretaria da Agricultura de SP. O seu principal objetivo é fornecer informações e notícias atuais e promover atividades e pesquisas sobre a cultura da oliveira no estado de São Paulo (BERTONCINI, 2018). No estado de São Paulo, estima-se que seja cultivada uma área com 375 hectares divididos em 27 municípios, com cerca de 40 produtores (BERTONCINI, 2018).

As oliveiras apresentam, dentre outros fatores limitantes, inúmeras doenças, como o declínio rápido causado pela bactéria *Xyllela fastidiosa* (COLETTA-FILHO *et al.*, 2016), e doenças fúngicas que atacam a parte aérea como antracnose (*Colletotrichum acutatum*) e o repilo (*Fusicladium oleaginum*), o sistema radicular como verticilose (*Verticillium dahliae*), podridão das raízes (*Phytophthora* sp.) assim como nematóides (*Helicotylenchus dihystra*, *Pratylenchus brachyurus*) (ROSA; OLIVEIRA, 2020) e insetos-pragas como traça-da-oliveira (*Palpita* spp.), cochonilhas e as formigas-cortadeiras (COUTINHO *et al.*, 2009; PRADO; SANTA-CECÍLIA; ALVARENGA, 2012).

As formigas-cortadeiras, como são conhecidas popularmente, estão divididas em dois gêneros: *Atta* sp. (saúva) com dezessete espécies e *Acromyrmex* sp. (quenquém) com trinta e cinco espécies, ambos os gêneros apresentam distribuição desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos (ANTWEB, 2020). Elas são insetos de importância econômica em locais onde prevalecem monoculturas, chamadas assim de pragas agrícolas, por causarem desfolha nas plantações, por exemplo, em silvicultura composta por *Eucalyptus* e *Pinus* (ZANETTI *et al.*, 2014). Estima-se que cerca de 75%

das espécies de plantas que ocorrem na região neotropical sejam forrageadas pelas formigas-cortadeiras, o que as tornam um herbívoro dominante por consumirem grande quantidade de material vegetal nesses ecossistemas (CHERRETT, 1986; FOWLER *et al.*, 1989).

Na cultura da oliveira, as formigas-cortadeiras são consideradas um inseto-praga de grande importância por limitarem o estabelecimento do cultivo, ocasionando desfolha tanto nas mudas quanto em plantas maduras (PRADO, SANTA-CECILIA, ALVARENGA, 2012). Por ser uma cultura relativamente recente no país, ainda não existe estudo sobre defesas que a oliveira possa desencadear frente ao corte desses insetos. Sabe-se que é uma planta altamente atrativa para as formigas-cortadeiras principalmente mudas, entretanto não é incomum encontrar relatos de ataques em plantas mais velhas, o que ocasiona um alto prejuízo ao produtor.

Podemos inferir que, devido às oliveiras apresentarem origem distinta da área natural de ocorrência das formigas-cortadeiras, elas não apresentam defesas contra esse tipo de herbívoros, tornando-as suscetíveis ao corte e desfolha por esses insetos. Contudo, visando mitigar essas perdas, o método de controle mais comumente utilizado e eficiente são as iscas tóxicas ou iscas granuladas (BRITTO *et al.*, 2016). Atualmente, os princípios ativos mais utilizados para a produção de iscas tóxicas são fipronil e sulfluramida, os quais são considerados como prejudiciais ao meio ambiente e ao ser humano mesmo em doses baixas (BRITTO *et al.*, 2016, ZANETTI *et al.*, 2014).

Um outro entrave em relação à isca, é seu uso indiscriminado e sem cálculo de dosagens, o que pode interferir diretamente na eficiência do controle desse inseto. Casos de subdosagens são comuns em áreas de plantio onde o produtor disponibiliza uma dosagem menor que a necessária para o controle e após alguns dias oferece novamente as iscas ao mesmo formigueiro ¹

Uma fonte alternativa de controle que tem ganhado destaque em pesquisas são os microrganismos, principalmente os fungos. O uso de microrganismos tem conquistado bons resultados em testes *in vitro* para controle de formigas-cortadeiras. Estudos com microrganismos endofíticos têm demonstrado grande potencial, como promoção de crescimento, proteção contra estresses abióticos, resistência a doenças, respostas contra herbívoros (AZEVEDO *et al.*, 2002, COBLENTZ *et al.*, 2013; VAN BAEL *et al.*, 2009).

¹ (Comunicação pessoal Fazenda em Pinhalzinho, janeiro de 2017).

Os microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior de tecidos vegetais sem causar danos aparente ao seu hospedeiro (AZEVEDO, ARAÚJO, 2007).

No Brasil, os estudos com endofíticos iniciaram-se em meados de 1980, os quais envolviam principalmente bactérias endofíticas (AZEVEDO; ARAÚJO *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2000) em culturas importantes para o estado de São Paulo como *Citrus* sp. (LACAVA *et al.*, 2004, 2007). Desde então, estudos buscando conhecer a diversidade de endofíticos, nichos e os possíveis potenciais biotecnológicos (como uso de enzimas e metabólitos secundários) têm aumentado muito os trabalhos com esses grupos de microrganismos (GARBEVA *et al.*, 2001; HARDOIM *et al.*, 2015; WHIPPS *et al.*, 2008).

Os endofíticos apresentam grande área de aplicação, desde auxílio na promoção de crescimento de plantas, em outros casos associando-se com as raízes (como no caso dos fungos micorrízicos), proteção contra condições adversas (como falta de água, alta ou baixa temperaturas) e proteção contra ataques de herbívoros. (COBLENTZ; VAN BAEL, 2013).

Estudos com herbívoros predadores, como as formigas cortadeiras (*Atta colombica*) demonstraram a preferência de corte por plantas com baixa incidência de fungos endofíticos (ESTRADA *et al.*, 2015), mesmo em colônias de diferentes idades como maduras e recém-emergidas (COBLENTZ; VAN BAEL, 2013). Esses resultados indicam que os fungos presentes nas folhas desempenham ação antagonista ao fungo mutualista da formiga-cortadeira, podendo apresentar função defensiva nas plantas estudadas (COBLENTZ; VAN BAEL, 2013; ESTRADA *et al.*, 2015). Além da diminuição do corte, também é possível que haja rejeição de algumas folhas cortadas pelas formigas-cortadeiras nas proximidades de entradas nos formigueiros.

Estudo realizado por Rocha e colaboradores (2017) estudou os fragmentos rejeitados, tendo observado nestes maior frequência de fungos do gênero *Trichoderma* conhecidos por se comportarem como endófitos e por serem micoparasitas. A coleta de material foliar com menor abundância de endófitos pode ser vantajosa para a colônia por uma variedade de razões: endofíticos carregados para a colônia têm potencial de competir diretamente por substrato com *L. gongylophorus*; ou endofíticos podem ser capazes de produzir micotoxinas que causem diminuição do crescimento do mutualista (COBLENTZ; VAN BAEL, 2013).

A seleção de material foliar com poucos fungos endófitos também podem estar relacionada ao custo do trabalho (corte e processamento) das folhas (BITTLESTON *et al.*, 2011). Van Bael *et al.*, (2009) demonstrou que as formigas-cortadeiras demoram mais para cortar folhas de *Merremia umbellata* com altos níveis de endófitos. Pesquisas realizadas no Panamá com formigas-cortadeiras mostraram que esses insetos gastam mais tempo processando e selecionando folhas que contém certos gêneros de fungos, o que sugere que a presença de fungos endofíticos são considerados na preferência de corte e forrageamento (VAN BAEL *et al.*, 2009, ROCHA *et al.*, 2017).

Além do comportamento, os pesquisadores também investigaram quais fatores relacionados às plantas influenciam o forrageamento das formigas-cortadeiras, incluindo os efeitos dos metabólitos secundários, valor nutricional da planta, idade e tenacidade da folha (BITTLESTON *et al.*, 2011). Boa parte da dificuldade de se estabelecer a preferência de corte por formigas-cortadeiras está no fato de que diversos fatores isolados ou combinados podem influenciar o forrageamento, como a escolha de folhas mais jovens devido à facilidade de corte, sua falta de endófitos fúngicos, sua qualidade nutricional ou todos esses fatores combinados (COBLENTZ; VAN BAEL, 2013; VAN BAEL; SEID; WCISLO, 2012).

Como a cultura da oliveira é considerada recente no país, pouco se sabe sobre a preferência de corte das pragas da região sobre as plantas. Segundo a observação de produtores (**comunicação pessoal**) nos estados de SP e MG, as formigas-cortadeiras apresentam uma preferência pelas cultivares *Arbequina* e *Koroneiki*, contudo estudos ainda são necessários para confirmar esse fato.

2.3 Estudos independentes de cultivo

O advento do Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) levou a novas ideias e respostas sobre relações filogenéticas e funcionais das comunidades microbianas e, conseqüentemente, possibilitou explorar uma ampla gama de fatores que as influenciam, tais como as espécies de plantas e até mesmo seus compartimentos (GARBEVA *et al.*, 2001, MARTINEZ-DIZ *et al.*, 2019). Essas técnicas contribuíram significativamente para um melhor entendimento sobre as interações planta-micróbio e interações microbianas em plantas (GARBEVA *et al.*, 2001; HARDOIM *et al.*, 2015).

Comumente, pesquisadores analisavam a diversidade de microrganismos endofíticos separadamente por grupo, como bactérias ou fungos. Entretanto, as novas metodologias possibilitam fazer inferências sobre interação entre os grupos de microrganismos endofíticos e destes com o seu hospedeiro, tornando este campo de pesquisa fascinante (BERGELSON *et al.*, 2019; FREY-KLETT *et al.*, 2011).

Baseados em estudo sobre o microbioma de raízes de *Arabidopsis*, Bergelson e colaboradores, (2019) sugerem que análises futuras devem abranger os vários reinos de microrganismos presentes e que genes envolvidos não somente na defesa, mas também na morfologia e fisiologia da planta influenciam o microbioma.

Os estudos sobre as comunidades microbianas por métodos dependentes de cultivo são limitados pela capacidade do meio de cultura utilizado permitir ou não o crescimento dos microrganismos presentes. Uma vez isolados, os microrganismos poderão ser utilizados para fins de bioprospecção. Por outro lado, métodos independentes de cultivo possibilitam conhecer a diversidade microbiana presente nas plantas em todos os seus estratos (solo, folha, caules), permitindo realizar inferências mais abrangentes sobre as interações e seus efeitos (DISSANAYAKE *et al.*, 2018; VELOSO *et al.*, 2020).

Muitos endofíticos não são cultiváveis, portanto, abordagens independentes de cultura, como NGS, podem ajudar a compreender melhor sua ecologia e distribuição. Abordagens utilizando tanto as técnicas dependentes como as independentes de cultura em videira, por exemplo, demonstraram a importância de estudar a composição da comunidade endofítica de fungos nessas plantas (DISSANAYAKE *et al.*, 2018). Em uma outra pesquisa Skaltsas e colaboradores (2019) aplicaram ambas metodologias e verificaram que o estágio de desenvolvimento (plântula e planta adulta) em dois gêneros de plantas (*Hevea* e *Micrandra*) na Amazônia alterava diversidade de fungos endofíticos. Segundo Pereira e colaboradores (2012), também utilizaram ambos os métodos para explorar a diversidade bacteriana em raízes de arroz, e demonstraram que as técnicas são complementares.

Estudos de sequenciamento de alto rendimento (*High Throughput Sequencing* - HTS) de comunidades de fungos estão reconstruindo o mapa do reino dos fungos, expondo sua enorme e anteriormente desconhecida diversidade taxonômica e funcional (NILSSON *et al.*, 2019). Isso também foi observado para as bactérias, onde com sequenciamento HTS constitui uma poderosa ferramenta para a caracterização rápida, de

alto rendimento e em profundidade da composição da comunidade microbiana usando sequenciamento de *amplicon* do gene 16S rRNA (MCADAM *et al.*, 2014).

Desta forma, a combinação de métodos tradicionais de cultivo e NGS, possibilitará caracterizar a diversidade de microrganismos endofíticos associados às oliveiras no Brasil. Espera-se que os resultados possam servir de base para aplicações práticas, como o isolamento de fungos para uso biotecnológico em diversas áreas como fitopatologia, controle de insetos pragas entre outros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as comunidades de microrganismos (bactérias e fungos) endofíticos associados a folhas de oliveiras (*Olea europaea* L.) cultivadas no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

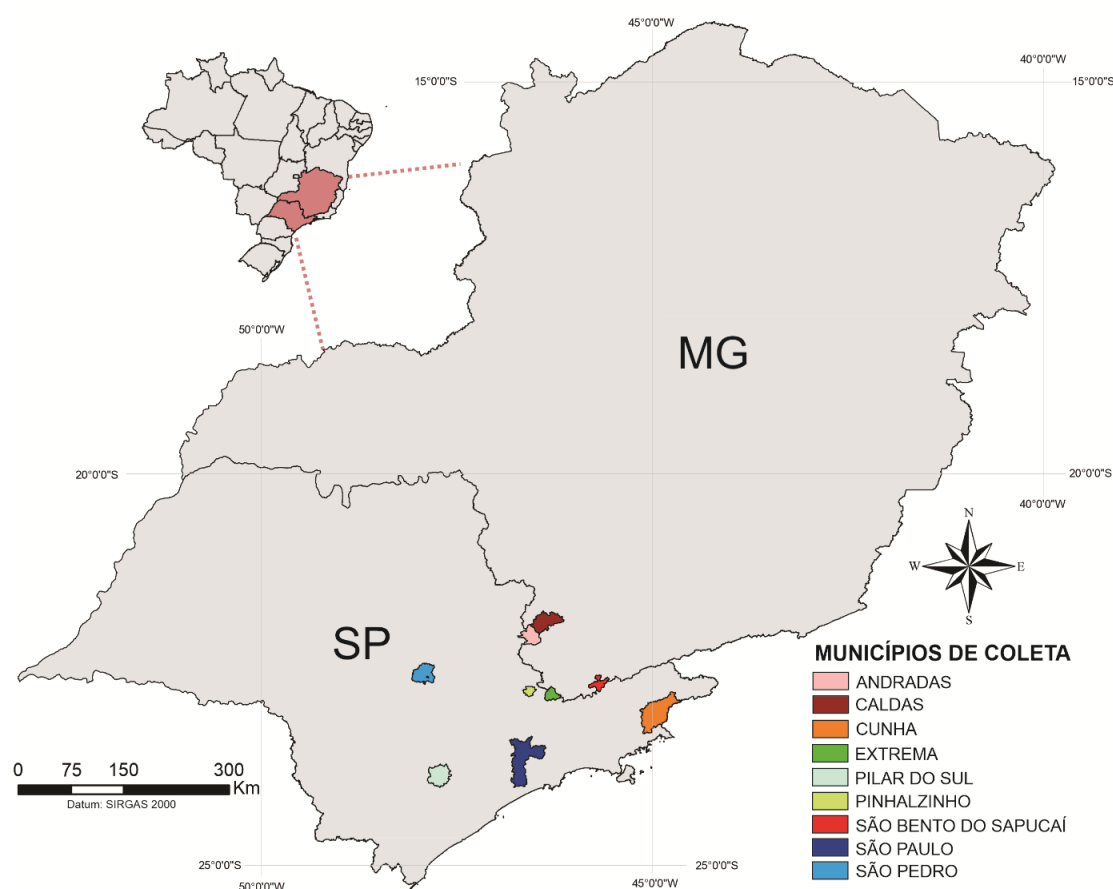
- Identificar a comunidade microbiana de fungos e bactérias em folhas de oliveiras por meio de *metabarcoding* e sequenciamento de nova geração (NGS);
- Explorar fatores que podem influenciar essas comunidades microbianas, tais como idade, altitude, cultivares e geografia;
- Relacionar as comunidades de bactérias e fungos e predizer tipos de associações entre estes microrganismos nas folhas de oliveiras;
- Isolar fungos endofíticos associados às folhas de oliveira por método dependente de cultivo ;
- Identificar guildas ecológicas para os fungos obtidos pelos métodos dependente e independente de cultivo;
- Verificar a preferência de corte por formigas-cortadeiras (*Atta sexdens*) entre as principais cultivares de oliveira plantadas em fazendas de São Paulo e Minas Gerais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de coleta

O estudo foi realizado em fazendas localizadas na região sudeste do Brasil, nos estados de São Paulo foram amostradas seis fazendas e no estado de Minas Gerais três fazendas. Os municípios do estado de São Paulo onde foram realizadas coletas foram: Cunha (CUN), Pinhalzinho (PIN), São Pedro (SPD), Pilar do Sul (PDS), São Bento do Sapucaí (SBS) e São Paulo (SP). Para o estado de Minas Gerais foram: Extrema (EXT), Andradas (AND) e Caldas (CAL) (Figura 1). De cada cultivar disponível em cada fazenda, foram selecionadas aleatoriamente três árvores, totalizando 93 árvores amostradas. A seguir, oito ramos com folhas saudáveis foram coletados de cada planta, imediatamente fez-se um *pool* para cada árvore e as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos dentro de caixa de isopor para transporte até o laboratório.

Figura 1. Mapa das áreas de coleta. Em destaque, os municípios onde foram amostradas as folhas de oliveiras em fazendas nos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG).



Fonte: André Renan Silva

4.2 Desinfecção superficial das folhas

As folhas foram destacadas dos ramos e, em seguida, lavadas em água corrente com detergente para retirar as sujidades. As folhas foram avaliadas quanto a aparência da superfície para excluir amostras que apresentassem sintomas de doença ou danos superficiais. A desinfecção da superfície foi feita por lavagem sequencial em etanol 70% por 5 min, solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 min e etanol 70% por 30 s, seguido de três lavagens em água destilada estéril. Para confirmar que o processo de desinfecção foi bem-sucedido, alíquotas da água destilada estéril usada no enxágue final foram semeadas no meio batata dextrose e ágar (BDA) e as placas foram examinadas quanto ao crescimento após a incubação a 28°C por 7 dias. A metodologia foi adaptada a partir de Araújo *et al.* (2002).

4.3 Extração de DNA das folhas

As folhas esterilizadas superficialmente foram congeladas usando nitrogênio líquido e homogeneizadas usando um pistilo plástico em um tubo de 1,5 mL. Posteriormente foram adicionados 600 µL de tampão de extração de brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB, 100mM Tris-HCl; 1,4M NaCl; 20mM EDTA, 2-mercaptoetanol, pH 8,0) e incubado a 65°C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) em cada tubo e misturados em vortex para formar uma emulsão. A mistura foi centrifugada a 12.000 g durante 15 min a 4°C e 500 µL da fase aquosa foram transferidos para um tubo limpo de 1,5 mL. Foram adicionados 50 µL de solução CTAB 10%NaCl 0,7 M pré-aquecida a 65°C. Em seguida foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturados por inversão e centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4°C. Os 500 µL da fase aquosa foram transferidos para um tubo limpo de 1,5 mL, 300 µL de isopropanol foram adicionados e misturados por inversão, em seguida foram centrifugados a 12.000 g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo DNA foi lavado com etanol 70% duas vezes e seco usando em centrífuga a vácuo (Concentrator 5301; Hamburgo, Alemanha) por 10 min ou até secar completamente. O pellet de DNA foi então ressuspensado em 70 µL de água ultrapura estéril. A concentração de DNA foi medida com o fluorímetro Quantifluor (Promega, Lyon, França), de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 Construção das bibliotecas *Illumina Miseq 16S rRNA e ITS*

A amplificação da região V4 de 16S rRNA (primers 515F/806R) foi realizada em triplicata seguindo os protocolos do Earth Microbiome Project (EMP) (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/>) Thompson *et al.*, (2017), também descrito em Caporaso *et al.*, (2012) e para os fungos utilizamos a região ITS (ITS1f/ITS2) (GARDES; BRUNS, 1993; WHITE *et al.*, 1990). Três controles negativos como amostras em branco (correspondendo a água ultrapura em vez de DNA na reação de PCR) foram usados para detectar contaminantes que possam ter sido adicionados no processo de obtenção dos dados. As reações de PCR seguiram as recomendações do Taq Platinum Kit (Invitrogen, Schwerte, Alemanha) com 2,5 µl de tampão 10X, 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,0 µL de dNTPs 10 mM, 1,0 µL de BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/ml, 0,5 µL de cada iniciador 10 mM, 0,5 µL de Taq Platinum 5U/µL, 5 µL de DNA (10 ng/µL), 13,0 µL de água para PCR (ultrapura e autoclavada livre de DNA). A reação foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 95°C por 3 min, 30 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 30s, com final de 72°C por 10 min e 4°C por tempo indeterminado. A purificação foi realizada com as *beads* Ampure XP e as ligações dos adaptadores utilizando o kit NEXTERA XT (Illumina) também foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas via Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). O agrupamento e a normalização foram realizados de modo que as amostras tivessem a mesma concentração. Em seguida, o *pool* de DNA foi diluído até 2 nM, desnaturado e, em seguida, diluído para uma concentração final de 16 pM com um PhiX de 20% para sequenciamento 2 x 250 pb em equipamento MiSeq (Illumina) no Centro de Genômica (ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil).

4.5 Análises de bioinformática

Os dados das sequências demultiplexada foram analisados usando o Qiime2-2019.7 (BOLYEN *et al.*, 2019) com o plugin de demux (BOLYEN *et al.*, 2019). O controle de qualidade das sequências e a construção da tabela de características foram realizados por meio do plugin Dada2 (CALLAHAN *et al.*, 2016; MCDONALD *et al.*, 2012). A atribuição taxonômica foi realizada com o banco de dados SILVA_132_QIIME e o ASV (variantes de sequência de amplicon) foram selecionados com identidade de 99% (QUAST *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2014) e para gerar a tabela de taxonomia as leituras de sequência emparelhadas foram aparadas na região v4 do rDNA 16S com os

iniciadores 515F/806R. Para comunidades fúngicas, usamos os primers ITS1f/ITS2 e a atribuição taxonômica foi realizada com o banco de dados UNITE (UNITE COMMUNITY, 2019). Desse modo, um classificador próprio foi criado usando o comando "feature-classifier fit-classifier-naive-bayes". Uma vez obtido o classificador, as leituras (rep-seqs) foram classificadas por táxon usando o comando "feature-classifier classify-sklearn" (BOKULICH *et al.*, 2018) e finalmente obtemos a tabela de recursos. Seguindo as recomendações de Łukasik *et al.*, (2017), desde a extração até o sequenciamento da biblioteca, os três controles negativos foram incluídos, e os contaminantes foram removidos por meio do pacote Decontam (DAVIS *et al.*, 2018) usando o software R (TEAM, R., 2019). Para isso, o método de prevalência foi o que conseguiu filtrar melhor nossos dados e remover o maior número de contaminantes e por isso foi aplicado em nossas amostras. Esses dados descontaminados foram então trazidos de volta para Qiime2, onde a filtragem subsequente também removeu mitocôndrias e cloroplasto das tabelas de recursos. Com o comando feature-table summarize foi criado um resumo visual dos dados 16S rRNA e ITS. Para o conjunto de dados 16S rRNA, a inferência da árvore filogenética foi realizada usando o SEPP de inserção de fragmento (MIRARAB; NGUYEN; WARNOW, 2012) e para o conjunto de dados ITS, essa inferência foi realizada usando o comando align-to-tree-mafft-fasttree (KATOHI *et al.*, 2013), ambos no Qiime2.

4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o teste Permanova com métrica de distância Bray-Curtis (MCARDLE; ANDERSON, 2001), que considera a composição e abundância de todas as categorias, testando idade, altitude, município e cultivares da oliveira. Em todos os testes, o parâmetro "p-pairwise" foi aplicado para determinar quais pares específicos de grupos diferem entre si. Por exemplo, dentro da categoria faixa etária, todas as opções foram testadas em pares.

Para visualizar as relações entre as bactérias e fungos em folhas de oliveiras, foi realizada análise de componentes principais (PCoA) e estatísticas relacionadas no pacote de software PAST4 (CLARKE *et al.*, 1993; HAMMER *et al.*, 2001; MCMURDIE *et al.*, 2013). Além disso, por meio da análise de Simper, foi explorada a contribuição dos principais ASVs das bactérias e fungos (HAMMER *et al.*, 2001). Para testar se existem

táxons diferencialmente abundantes nos grupos de amostras (ou seja, bactérias de plantas com diferentes idades e localidades), foi utilizado um plugin de análise de poder estatístico ANCOM (análise de composição de microbiomas) implementado no Qiime2 (MANDAL *et al.*, 2015). Em seguida, foram procuradas correlações significativas entre as ASVS de bactérias e fungos realizando uma Análise de Correlação Canônica Regularizada (rCCA) para integrar vários conjuntos de dados usando o rCCA e funções de rede do pacote mixOmics r (GONZÁLEZ *et al.*, 2008; ROHART *et al.*, 2017). A rede foi editada e visualizada no software Cytoscape (SHANNON *et al.*, 2003). Utilizou-se para comparação e conhecimento dos grupos ecológicos o site FunGuild (NGUYEN *et al.*, 2016), por meio do qual foi possível fazer inferências e agrupá-los por modo trófico. As análises filogenéticas foram feitas com o IQ-Tree (TRIFINOPOULOS *et al.*, 2016) e as árvores foram desenhadas e editadas no iTOL (LETUNIC; BORK, 2019).

4.7 Isolamento de fungos endofíticos

As folhas foram desinfestadas superficialmente de acordo com a metodologia descrita no item 4.2 deste trabalho, de acordo com Araújo *et al.*, (2002). As folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm x 1 cm com lâmina cirúrgica estéril. Os fragmentos provenientes das folhas esterilizadas foram colocados em placas contendo meio de cultura batata dextrose e ágar (BDA), suplementado com 500 mg/L de pentabiótico para suprimir o crescimento bacteriano e, em seguida, incubados a 25°C em B.O.D até que o crescimento de fungos endofíticos fosse detectado. As pontas de hifas originárias de segmentos vegetais foram transferidas para placa de BDA sem antibióticos. Cada isolado fúngico foi verificado quanto à pureza e transferido para o novo meio de cultura. Para cada árvore amostrada foram feitas cinco placas com 10 fragmentos esterilizados em cada uma. Os fungos foram agrupados em morfotipos que por sua vez foram baseados na coloração, crescimento e morfologia da colônia. Os fungos isolados foram agrupados em morfotipos, um representante de cada morfotipo foi selecionado para identificação molecular.

4.8 Extração de DNA a partir dos micélios

O DNA genômico foi extraído de culturas frescas usando o protocolo modificado de Doyle; Doyle (1987) e Lee; Taylor (1990). Os micélios frescos foram raspados da

superfície da placa de ágar e transferidos para um tubo de 1,5 ml com 500 µL de tampão de extração CTAB (CTAB 2%, Tris- HCl 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, pH 8,0). Os micélios fúngicos foram triturados com pistilo de plástico e então incubados a 65°C por 60 min, misturando ocasionalmente. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) em cada tubo e misturado no vórtex até formar a emulsão. A mistura foi centrifugada a 12.000 g durante 15 min à temperatura ambiente e 500 µL da fase aquosa foram transferidos para um tubo de 1,5 ml novo. Em seguida, foram adicionados 300 µL de isopropanol em cada tubo, misturados por inversão e centrifugados a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo DNA foi lavado com etanol 70% duas vezes e seco usando centrífuga a vácuo (Concentrator 5301; Hamburgo, Alemanha) por 10 min ou até secar. O pellet de DNA foi então ressuspensionado em 70 µL de água ultrapura estéril.

4.9 PCR e sequenciamento Sanger

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificar a região ITS (internal transcribed spacer), localizada entre os genes codificadores dos RNA ribossomais 18S e 28S, usando os iniciadores universais ITS1-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990) e as seguintes condições do termociclador: 94 ° C por 5 min; 30 ciclos de 94 ° C por 30 s, 54 ° C por 30 s, 72 ° C por 1 min; e extensão final a 72 ° C por 5 min. Os tamanhos dos produtos amplificados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR foram purificados usando um kit de purificação de PCR illustra™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e o sequenciamento foi realizado com o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acordo com a recomendação do fabricante e o sequenciamento foi feito no equipamento ABI 3500 (ThermoFisher Scientific).

4.10 Análises de bioinformática para os isolados fúngicos

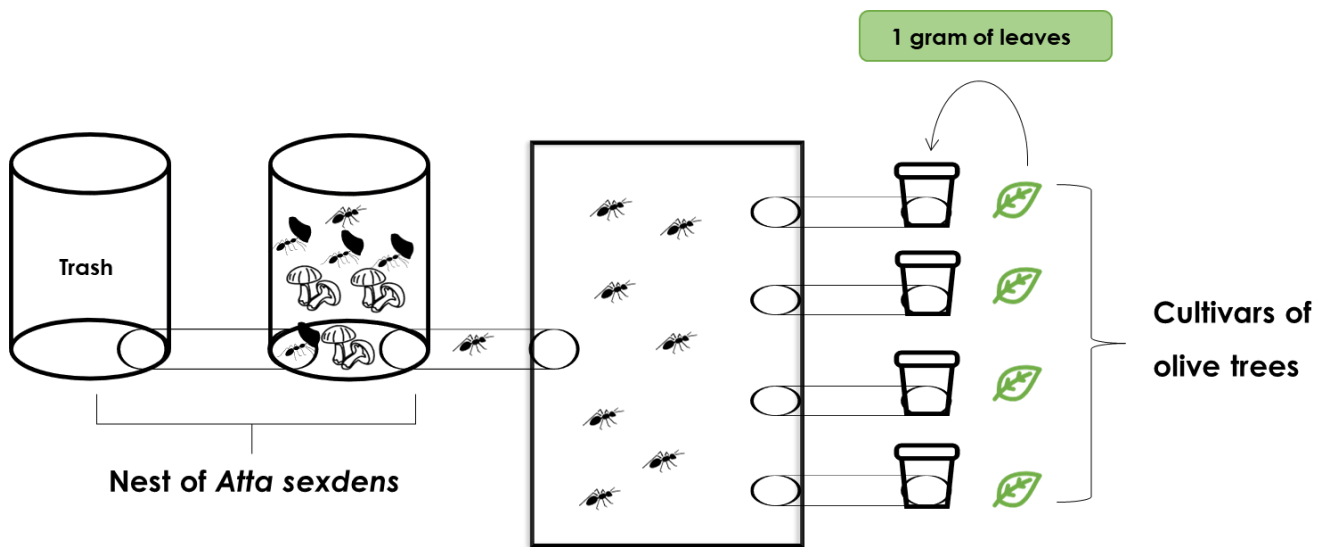
As sequências da região ITS foram editadas manualmente usando o software Bioedit (HALL, 1999) e alinhadas utilizando Clustal-X. As pesquisas das sequências de nucleotídeos (BLASTn) foram realizadas usando o banco de dados GenBank do National

Center for Biotechnology Information (NCBI) para identificar as sequências mais semelhantes de cada isolado fúngico. Para investigar diversidade funcional utilizamos o banco de dados FunGuild (NGUYEN *et al.*, 2016) explorando o nível trófico dessa comunidade.

4.11 Teste de preferência de corte das formigas-cortadeiras entre cultivares de oliveiras

O experimento foi conduzido no Laboratório de Formigas Cortadeiras UNESP Rio Claro - SP. Foram utilizadas as quatro cultivares mais plantadas no estado de São Paulo e Minas Gerais: Arbequina, Grappolo, Koroneiki e Picual. Utilizou-se 1g de folhas de cada cultivar por tratamento, com seis repetições. Em cada tratamento foi usado um ninho de *Atta sexdens* criado artificialmente em laboratório à $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. O material vegetal padrão usado na criação constou de folhas de alfeneiro (*Ligustrum lucidum*). Cada ninho continha 1L de jardim de fungo e foram deixados sem oferta de material vegetal padrão durante 48h antes do teste de preferência. A panela de alimentação foi substituída por uma arena de forrageamento, que constou de uma bandeja plástica de 30 cm x 10 cm, conectada com quatro canos de plástico que ligava a potes plásticos de 10 cm de diâmetro e 7 cm de altura. Em cada pote plástico eram colocadas as folhas dos diferentes cultivares, que foram sorteados antes da disposição (Figura 2). O experimento foi concluído quando uma das cultivares foi totalmente cortada e transportada da arena de forrageamento. O peso restante das folhas foi submetido ao teste ANOVA post-hoc de Tukey valor $p = 0,005$.

Figura 2. Esquema do ninho de *Atta sexdens* utilizado para o teste de preferência de corte entre os principais cultivares plantados nos estados de São Paulo e Minas Gerais.



5 RESULTADOS

Artigo 1

Predicting factors of endophytes diversity associated with olive trees (*Olea europaea*)

Amanda Aparecida de Oliveira ^{1,2}, Ana Eugênia de Carvalho Campos ², Manuela de Oliveira Ramalho ³, Corrie Saux Moreau ^{3,4}, Ricardo Harakava ² & Odair Correa Bueno ¹.

1-São Paulo State University (UNESP) – Institute of Biosciences - Campus Rio Claro, Departamento de Biologia Geral e Aplicada e Centro de Estudos de Insetos Sociais. Avenida 24A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro - SP, Brazil.

2- Biological Institute of São Paulo – Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, 04014-002, São Paulo -SP, Brazil.

3-Cornell University, Department of Entomology, Ithaca, NY, 14853, USA.

4- Cornell University, Department of Ecology and Evolutionary Biology, Ithaca, NY, 14853, USA.

Corresponding author: Amanda A. de Oliveira

São Paulo State University

Departamento de Biologia Geral e Aplicada e Centro de Estudos de Insetos Sociais.

Avenida 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro - SP.

Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil

Email: oliveira.amandah@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-7283-2752

Acknowledgment

UNESP, Biological Institute of Sao Paulo and CALS Cornell University and CAPES finance code 001 grant.

Abstract

The olive crop has expanded its cultivation areas in Brazil, mainly in the southeastern region in the states of São Paulo and Minas Gerais. As it is still an expanding culture, little is known about factors that can influence the diversity of endophytic microorganisms. With that, the objectives were to identify the diversity of fungi and endophytic bacteria associated with olive leaves using new generation sequencing through metabarcoding; to verify the influence of altitude, cultivar, age, and geography factors in this microbial community; identify which trophic levels for endophytic fungi and verify which types of correlations are present between the bacterial and fungal communities. Leaf samples were collected in six locations in the State of São Paulo and three in the State of Minas Gerais. The leaves were sterilized superficially before the extraction of genomic DNA. The library used to identify the fungi was built with the V4 region for 16S rRNA and the ITS region. The results showed that geography was an important factor, however, altitude, cultivar, and age did not influence the bacterial community associated with olive leaves. For the fungal diversity, the only factor that did not influence was the cultivar, while the others tested were significantly related. As for the trophic mode, the most abundant for the fungi was unidentified followed by pathotrophic, saprotrophic and symbiotrophic. The hypothesis that this occurred because with the approach of sequencing techniques such as NGS, many organisms have been identified, but, still little is known about the biology and trophic mode for example. The results of the network analysis between the two libraries showed a greater number of positive correlations between fungi and bacteria, suggesting that the observed relationships tend to be more complex and that some of these organisms such as fungi of the order Venturiales, Capnodiales are strongly associated with olive leaves.

Key-words

Endophytic fungi, NGS, Endophytic bacteria, olive trees, phyllosphere

Resumo

A olivicultura tem expandido suas áreas de cultivo no Brasil, principalmente na região sudeste nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Por ser uma cultura ainda em expansão pouco se conhece sobre fatores que podem influenciar na diversidade de microrganismos endofíticos. Com isso, os objetivos foram identificar a diversidade de fungos e bactérias endofíticas associada às folhas de oliveiras utilizando sequenciamento de nova geração através *metabarcoding*; verificar a influência dos fatores altitude, cultivar, idade e geografia nessa comunidade microbiana; identificar quais níveis tróficos para os fungos endofíticos e verificar quais tipos de correlações estão presente entre as comunidades bacteriana e fúngica. Foram coletadas amostras de folhas em seis localidades do Estado de São Paulo e em três no Estado de Minas Gerais. As folhas foram esterilizadas superficialmente antes da extração do DNA genômico. A biblioteca utilizada para identificação dos fungos foi construída com a região V4 para 16S rRNA e a região ITS. Os resultados demonstraram que a geografia foi um fator importante, entretanto, altitude, cultivar e idade não influenciaram a comunidade bacteriana associadas a folhas de oliveiras. Para a diversidade fúngica o único fator que não influenciou foi a cultivar, enquanto que os demais testados foram significativamente relacionadas. Quanto ao modo trófico, o mais abundante para os fungos foi não identificado seguido de patotrófico, sapotrófico e simbiotrófico. A hipótese que isso tenha ocorrido pois com a abordagem de técnicas de sequenciamento como o NGS, muitos organismos têm sido identificados, mas, ainda pouco se conhece sobre biologia e modo trófico por exemplo. Os resultados da análise de redes entre as duas bibliotecas apresentaram um maior número de correlações positivas entre fungos e bactérias sugerindo que as relações observadas tendem ser mais complexas e que alguns desses organismos como fungos da ordem Venturiales, Capnodiales estão fortemente associadas com folhas de oliveiras.

Palavras-chaves:

Fungos endofíticos, NGS, Bactérias endofíticas, oliveiras, filosfera

Introduction

Endophytic microorganisms, mainly fungi, and bacteria, have attracted increasing attention on the part of researchers, as they have important properties, such as providing resistance to their hosts under conditions of water stress, production of plant hormones and other compounds, such as enzymes and drugs of interest biotechnological (ARAÚJO *et al.*, 2000). Next generation sequencing (NGS) technologies have accelerated research in biological science during the last years by enabling the production of large volumes of sequence data to a drastically lower price per base, compared to traditional sequencing methods. The developments allow addressing research questions in plant-microbe biology that were not conceivable just a few years ago. (KNIEF, 2014) and the combination of cultivation-independent and improved cultivation technologies will allow the exploration uncultured groups living in association with plants (PEREIRA *et al.*, 2012; DINASSAYAKE *et al.*, 2018).

In surveys that infer the trophic level and guilds for fungi were conducted to explore also the functional diversity of microorganisms in the community in habitats such as soil and leaves (TEDERSOO *et al.*, 2014; SKALTSAS *et al.*, 2019, PANG *et al.*, 2019). Currently a tool that can be used for this purpose is the FunGuild, this database allows to know the trophic levels, guilds and fungal growth mode (NGUYEN *et al.*, 2016). According to Nguyen *et al.*, (2016) the concepts for trophic mode were (1) pathotroph = individuals receiving nutrients through the destruction of host cells (including phagotrophs); (2) symbiotroph = individuals receiving nutrients through the exchange of resources with host cells; and (3) saprotroph = individuals receiving nutrients through the destruction of dead host cells. Thus, we decided that these widely defined trophic modes work well in the ecology of the fungal community, since they reflect the main dietary habits of fungi. The olive crop has increased the planting area in Brazil and little is known about the microorganisms associated with the leaves. However, little is known about the community of endophytes associated with olive trees, thus demonstrating the relevance of our study.

Therefore, to better understand this endophytic diversity our goal were: 1) to identify the microbial community of fungi (ITS) and bacteria (16S rRNA) in olive trees through barcoding amplicon sequencing; 2) to explore factors that can be influential on these communities such as age, altitude, cultivar and geography; 3) to verify types of

associations between fungi and bacteria and 4) to predict the trophic modes based on FunGuild database.

Materials and Methods

Study site and sampling leaves of olive trees

The study was carried out on farms located in the southeastern region of Brazil. In the state of São Paulo six properties were sampled and for the state of Minas Gerais three properties. In the state São Paulo, properties were located in the following municipalities: Cunha (CUN), Pinhalzinho (PIN), São Pedro (SPD), Pilar do Sul (PDS), São Bento do Sapucaí (SBS) and São Paulo (SP). In the state of Minas Gerais, properties were located in: Extrema (EXT), Andradas (AND) and Caldas (CAL). Three trees were randomly selected from each cultivar available in each farm, totaling 93 trees sampled. Subsequently, eight branches with healthy leaves were collected from each plant individual and it did one pool for sample was done between every of cultivars and samples went conditioned in sterile plastic bags, labeled, and transported in a styrofoam box refrigerate until lab for the processing.

Fresh leaves and sterilized by immersion (ARAÚJO *et al.*, 2002) were freeze-dried using liquid nitrogen and homogenized using a sterilized mortar and pestle and then transferred to a tube 1.5 mL with 600 µL etyltrimethyl ammonium bromide extraction buffer (CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2-mercaptoethanol, pH 8.0) and incubated to 65°C for 60 min. Was added 600 µL of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) into each tube and mixed thoroughly to form an emulsion. The mixture was centrifuged at 12.000 rpm for 15 min at 4°C in a microcentrifuge and 500 µL the aqueous phase was removed into a clean 1.5ml tube. Was added 50 µL CTAB 2% (w/v) preheated 65°C. Were add 600 µL of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and mixed thoroughly was centrifuged at 12.000 rpm for 15 min at 4°C. The 500 µL the aqueous phase was removed into a clean 1.5ml tube was added 300 µL isopropanol into each tube and mixed thoroughly and was centrifuged at 12.000 rpm for 10 min. The supernatant was discarding and the pellet containing DNA was re-extracted with 70% ethanol twice and dried using Eppendorf Vacufuge (Concentrator 5301; Hamburg, Germany) for 10 min or until dry. The DNA pellet was then resuspended in 70 µL sterile water ultrapure.

The DNA concentration was measured using the Quantifluor (Promega, Lyon, France) staining kit, according to the manufacturer's instructions.

Construction library for Illumina Miseq 16SrRNA and ITS

Amplification of the V4 region of 16S rRNA (515F/806R primers) was performed in triplicate following Earth Microbiome Project (EMP) protocols (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/>) from Thompson *et al.*, (2017), also described in Caporaso *et al.*, (2012) and for the fungi we used ITS region (ITS1f / ITS2) (GARDES; BRUNS, 1993; WHITE *et al.*, 1990;). Three negative controls as blank samples (corresponding to water ultrapure instead of DNA in the PCR reaction) were used to remove contaminants that may have been added in the process of obtaining the data. PCR reactions followed recommendations from Taq Platinum Kit (Invitrogen, Schwerte, Germany) with 2.5 µL Buffer 10X, 1.0 µL MgCl₂ 50 mM, 1.0 µL dNTPs 10 mM, 1.0 µL BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL, 0.5 µL each primer 10 uM, 0.5 µL Taq Platinum 5U/µL, 5 µL template DNA (10 ng/µL), 13.0 µL PCR Water (Certified DNA-free). The reaction was submitted to the thermal cycler under the following conditions: 95 °C for 3 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, with final of 72 °C for 10 min and, 4 °C hold. Purification was performed with Ampure X beads and adapter ligations (NEXTERA XT) were also performed following the manufacturer's recommendations. Samples were quantified using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Pooling and normalization were performed so that samples had same concentration. DNA pool was diluted down to 2 nM, denatured, and then diluted to a final concentration of 16 pM with 20% PhiX for 2 x 250 pb sequencing on an Illumina MiSeq at the Centro de Genômica (ESALQ, Piracicaba, SP, Brazil).

Bioinformatic analysis

Demultiplexed sequence data were analyzed using Qiime2-2019.7 (BOLYEN *et al.*, 2019) with plugin demux (BOLYEN *et al.*, 2019). Sequence quality control and feature table construction were performed using Dada2 plugin (CALLAHAN *et al.*, 2016; MCDONALD *et al.*, 2012). Bacterial taxonomic assignment was conducted with SILVA_132_QIIME database and ASV (amplicon sequence variants) were selected with 99% identity (QUAST *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2014) and to generate the taxonomy

table paired-end sequence reads were trimmed in the v4 region of 16S rDNA with the 515F/806R primers. For fungal communities, primers ITS1f/ITS2 were employed and taxonomic assignment was conducted with the UNITE database (UNITE COMMUNITY, 2019). Thereby, a classifier was created using the "feature-classifier fit-classifier-naive-bayes" command. Once the classifier was obtained, reads (rep-seqs) were classified by taxon using the "feature-classifier classify-sklearn" command (BOKULICH *et al.*, 2018) and finally a feature table were obtained. Following the recommendations of Łukasik *et al.*, (2017), three negative controls were included, and contaminants were removed through Decontam package (DAVIS *et al.*, 2018) using R software (TEAM, R., 2019). The prevalence method removed the largest number of contaminants and therefore was applied to our samples. These decontaminated data were then brought back into Qiime2 where subsequent filtering also removed mitochondria and chloroplast from the feature-tables. The feature-table summarize command created a visual summary of the 16S rRNA and ITS data. For 16S rRNA dataset, inference of the phylogenetic tree was performed using fragment-insertion SEPP (MIRARAB; NGUYEN; WARNOW, 2012) and for ITS dataset, inference was performed using the align-to-tree-mafft-fasttree command (KATOHI *et al.*, 2013), all in Qiime2.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted with the Permanova test with Bray-Curtis distance metric by (MCARDLE; ANDERSON, 2001), that considers composition and abundance of all categories, testing age, altitude, geographic location and cultivars of the olives tree. In all tests the parameter – “p- pairwise” was applied to determine which specific pairs of groups differ from each other. For example, within the Age-group category, all options were tested in pairs. To visualize the associations between bacteria and fungi in leaves of olive trees, we implemented a principal component analysis (PCoA) and related statistics in the PAST4 software package (CLARKE *et al.*, 1993; HAMMER *et al.*, 2001; MCMURDIE *et al.*, 2013). In addition, through Simper's analysis we explored the contribution of the main ASVs and OTUs in the present study (HAMMER *et al.*, 2001). To test if there are any differentially abundant taxa in our sample groups (ie. bacteria from different age and county) we used a statistical power analysis ANCOM plugin (analysis of composition of microbiomes) implemented in

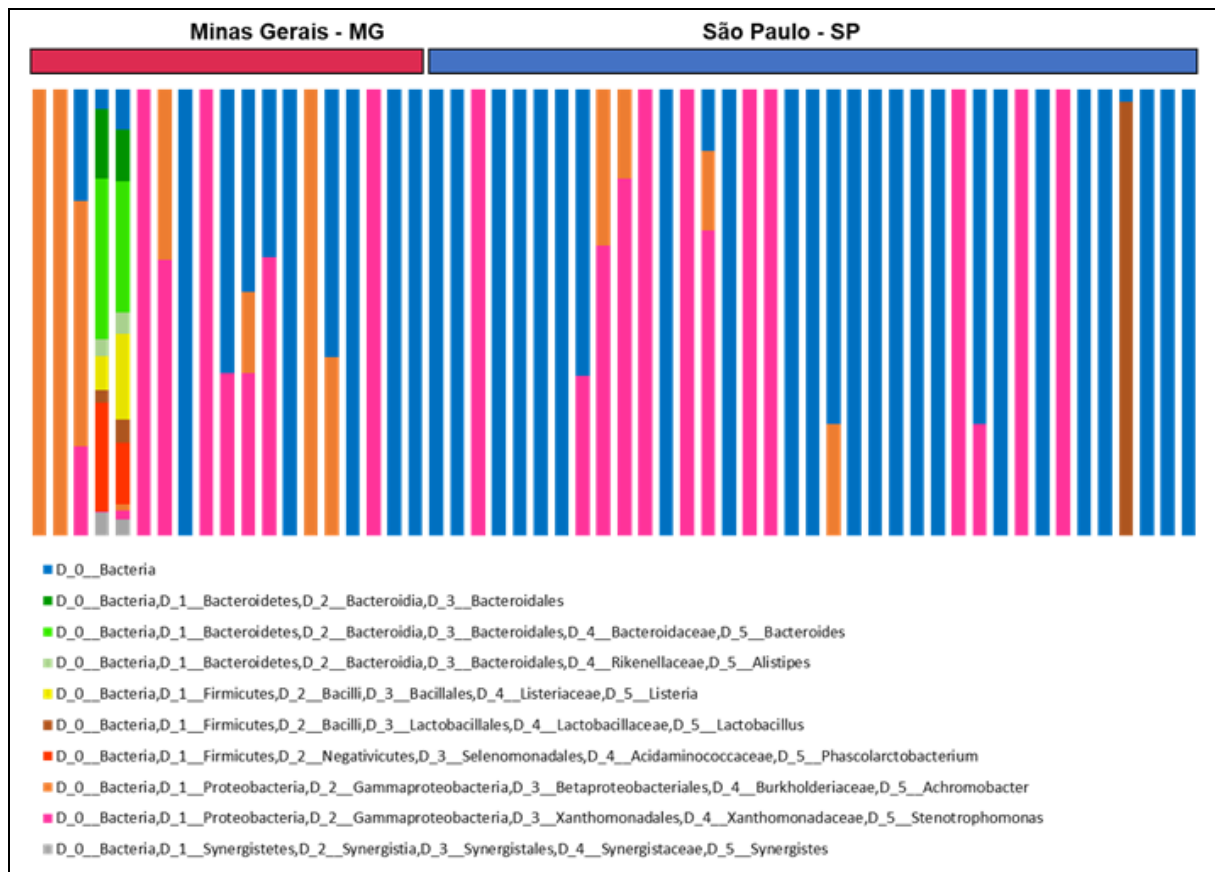
Qiime2 (MANDAL *et al.*, 2015). Next, we looked for specific correlations between bacterial ASVs and fungal ASVs by performing a Regularized Canonical Correlation Analysis (rCCA). Multiple data sets integration was done using rCCA and network functions from the mixOmics R package (GONZÁLEZ *et al.*, 2008; ROHART *et al.*, 2017). The network was edited and visualized in the software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). FunGuild was used to compare and identify ecological groups (NGUYEN *et al.*, 2016). Phylogenetic analysis was done with IQ-Tree (TRIFINOPOULOS *et al.*, 2016), and trees were drawing and edited in iTOL (LETUNIC; BORK, 2019).

Results

Bacterial community analysis through culture-independent methods

After removing low-quality sequences, mitochondrial, chloroplastic, and singletons, 134 Amplicon sequence variants (ASVs) were recovered. The main bacterial community recovered showed *Bacteroides* as the predominant bacterial genus (15%), followed by *Lactobacillus* (13%), *Stenotrophomonas* (10%), *Phascolarctobacterium* (10%), *Listeria* (5%), *Achromobacter* (4%) and others in smaller quantities. These six genera corresponded to 57% of the entire community. (Figure 1).

Figura 1. Bacterial alpha diversity of the main ASVs recovered from each sample of Olive tree's leaves. Each sample represents a different tree. Bar graphs for each library (one column = community from a sample) show the relative abundance of sequence reads classified under 99% similarity. Each color represents a distinct bacterium. The horizontal bars in the top indicate farms in the states of Minas Gerais (pink) and São Paulo (blue).



Alpha diversity of the bacterial communities in olive tree leaves

There was a significant difference in composition between the collection areas. Differences in alpha diversity were not found when the influence of plant age were tested Shannon Index (Kruskal-Wallis $H = 5.533$, $p\text{-value} = 0.236$). The same was observed for altitude ($H = 4.54$, $p\text{-value} = 0.097$), for geographic location ($H = 3.643$, $p\text{-value} = 0.456$) and for cultivars ($H = 3.643$, $p\text{-value} = 0.456$).

Beta diversity of the bacterial communities in olive tree leaves

Beta diversity results showed that age influence bacterial community in olive tree leaves (Permanova Bray-Curtis: all groups Pseudo- $F = 2.058$, $p\text{-value} = 0.005$, Figure 3B). Each age group was also compared in pairs, and significant results were obtained when bacterial communities associated with plants of ages four, five and seven years were compared to eight years old plants. When age eight was removed from the analysis, differences were no longer significant (Bray-Curtis Pseudo- $F = 1.037$, $p\text{-value} = 0.385$).

To explore this result more deeply, through SIMPER analysis, the main bacteria (ASVs) associated with age eight years, contributing to the differences observed, were *Stenotrophomonas*, followed by *Achromobacter* (Table 1). In the ANCOM analyses the genus *Stenotrophomonas* (W=43) was also pointed as the main contributor to differences observed.

Table 1. SIMPER analysis of main bacteria contributing to differences between age groups of olive trees with 10 ASV more frequents.

Age	Overall Average Dissimilarity	Most Influential OTUs / Taxonomy	Percent Contribution to Difference	Cumulative (%)
Four vs. Eighth	89.10 %	<i>Stenotrophomonas</i>	47,14	47,14
		<i>Achromobacter</i>	29,16	76,3
Five vs. Eighth	86.17 %	<i>Stenotrophomonas</i>	49,73	49,73
		<i>Achromobacter</i>	31,37	81,09
Seven vs. Eighth	82.39 %	<i>Stenotrophomonas</i>	50,45	50,45

Differences in beta diversity were not found when altitude was tested as a factor influencing the bacterial community (Permanova Bray-Curtis distance: Pseudo F = 0.706, p-value = 0.740). Same was observed for cultivar as a factor (Permanova Bray-Curtis distance: Pseudo F = 1.559, p-value = 0.078).

The results in beta diversity demonstrated the influence of geographic location of farms on the composition of bacterial communities (Permanova Bray-Curtis distance: Pseudo F = 2.051, p-value = 0.001). The SIMPER analysis showed that the most frequent bacteria were *Stenotrophomonas* and *Achromobacter*. The cumulative contribution of both account for more than 50% of the differences between counties (Table 2).

Table 2. SIMPER analysis of main bacteria contributing to differences between county groups of olive trees with 10 ASV more frequents.

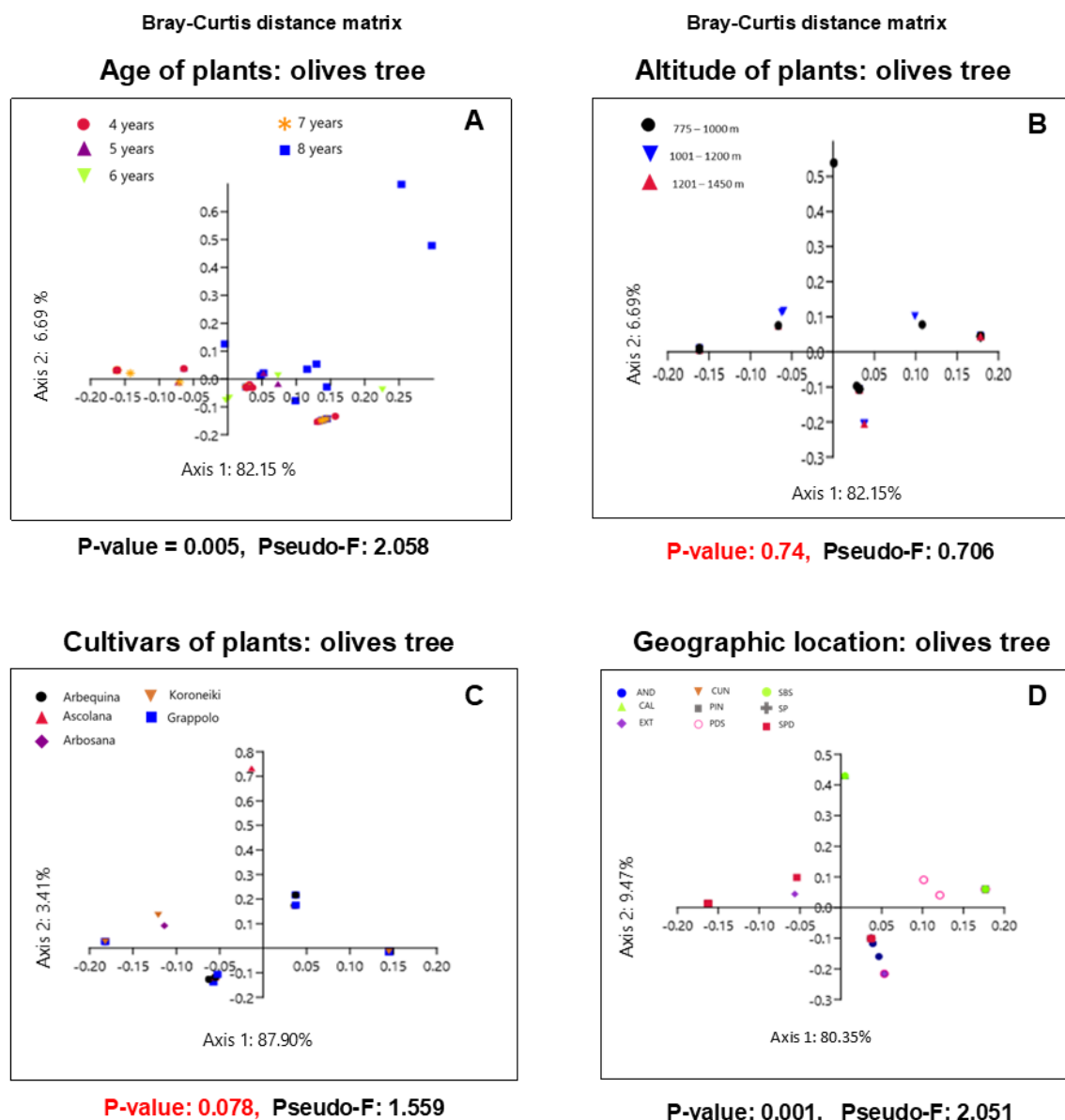
County	Overall Average Dissimilarity	Most Influential OTUs / Taxonomy	Percent Contribution to Difference	Cumulative (%)
AND vs. CAL	77.53 %	<i>Achromobacter</i>	29,84	29,84
		<i>Stenotrophomonas</i>	28,66	58,5
AND vs. CUN	94.2 %	<i>Achromobacter</i>	42,18	42,18
		<i>Stenotrophomonas</i>	23,23	65,41
AND vs. EXT	89.32 %	<i>Achromobacter</i>	41,19	41,19
		<i>Stenotrophomonas</i>	22,32	63,5
AND vs. PIN	92.22 %	<i>Achromobacter</i>	41,06	41,06
		<i>Stenotrophomonas</i>	23,61	64,67
AND vs. SBS	91.09 %	<i>Achromobacter</i>	40,48	40,48
		<i>Stenotrophomonas</i>	23,77	64,25
AND vs. SPD	99.79 %	<i>Achromobacter</i>	39,47	39,47
		<i>Stenotrophomonas</i>	18,57	58,04
CAL vs. CUN	71.04 %	<i>Stenotrophomonas</i>	84,47	84,47
CAL vs. EXT	81.36 %	<i>Stenotrophomonas</i>	77,12	77,12
CAL vs. SPD	85.71 %	<i>Stenotrophomonas</i>	71,66	71,66
CUN vs. PDS	77.11 %	<i>Stenotrophomonas</i>	84,06	84,06
EXT vs. PDS	84.08 %	<i>Stenotrophomonas</i>	77,04	77,04
PDS vs. PIN	80.31 %	<i>Stenotrophomonas</i>	81,15	81,15
PDS vs. SPD	85.71 %	<i>Stenotrophomonas</i>	71,99	71,99

Label: AND (Andradas), CAL (Caldas), EXT (Extrema) for Minas Gerais state; CUN (Cunha), PDS (Pilar do Sul), PIN (Pinhalzinho), SBS (São Bento do Sapucaí), SPD (São Pedro) and SP (São Paulo) for São Paulo state.

The ANCOM analyses showed that the taxa responsible for the differences in beta diversity between counties was genus *Stenotrophomonas* ($W=73$).

The principal coordinates analysis (PCoA) with Bray-Curtis distance matrix for factors affecting the composition of bacterial communities revealed not significant influence of altitude and cultivar, but the factors as age and geographic were important influencing the abundance and composition bacterial communities in leaves olive trees (Figure 2).

Figure 2. Beta diversity data with Principal coordinates analysis (PCoA) with Bray-Curtis distance illustrating bacterial community structure among leaves of the olive tree. **A.** PCoA for age of trees, each color represents the one different age. **B.** PCoA for altitude of farms collected, each color represents the one different scale of altitude. **C.** PCoA for cultivar each color represents different cultivars of olive trees. **D.** PCoA for geographic location influencing in communities bacterial, each color represents different farms, the abbreviations are of the municipalities of state São Paulo were: Cunha (CUN), Pinhalzinho (PIN), São Pedro (SPD), Pilar do Sul (PDS), São Bento do Sapucaí (SBS) and São Paulo (SP). In the state of Minas Gerais, properties were located in: Extrema (EXT), Andradas (AND) and Caldas (CAL). The statistics highlighted in red show p-values greater than 0.05.

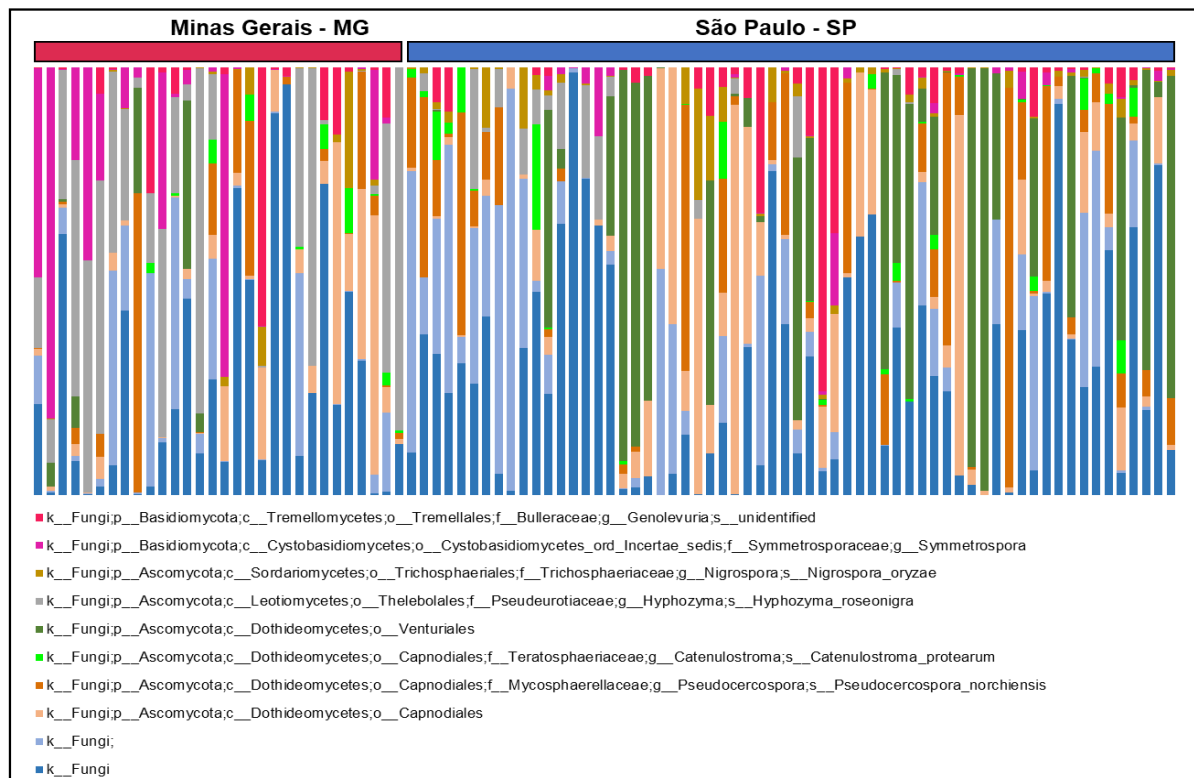


Fungal community analyses through culture-independent methods

After removing low-quality, chimeric and singletons ITS sequences, 2475 taxa were recovered and grouped into 661 Amplicon sequence variants (ASVs) of fungi associated with leaves of olive trees. The main taxa recovered revealed Dothideomycetes as the predominant fungi class (56%), followed by Leotiomycetes (9%), Tremellomycetes (8%), Cystobasidiomycetes (8%) and others with lower percentages. These four classes together corresponded to 81% of all ASVs. At the “Kingdom” level with correspond Unidentified Fungi (31%) “Order” level, the most frequent ASVs were Venturiales (12%) and Capnodiales (7%), and at the “Genus” level were *Pseudocercospora* (7%),

Hyphozyma (6%), *Symmetrospora* (3%), *Genolevuria* (2%), *Nigrospora* (1%) and *Catenulostroma* (1%) corresponded 74% of all ASVs (Figure 3).

Figure 3. Fungal Alpha diversity in olive tree leaves. Each sample represents a different tree. Bar graphs for each library (one column = community from a samples) show the relative abundance of sequence reads classified under 99% similarity. Each color represents the highest taxonomic level available in UNITE database. Each color represents a distinct bacterium. The horizontal bars in the top indicate farms in the states of Minas Gerais (pink) and São Paulo (blue).



Alpha diversity of the fungal communities in olive tree leaves

We found it that the alpha diversity for abundance and composition were influenced by plants ages, according to Observed_OTU ($H = 14.813$, $p\text{-value} = 0.005$). The altitude as a factor did not showed differences significative according to Observed_OTU ($H = 0.503$, $p\text{-value} = 0.777$). The same was observed for cultivar as a fator did not influencing in diversity of bacteria, according to Observed_OTU ($H = 1.480$, $p\text{-value} = 0.830$). Results for geographic location was significative, according Observed_OTU ($H = 39.691$, $p\text{-value} = 0.001$) (Suppl.2).

Beta diversity of fungal communities in olive tree leaves

The results for to explore the beta diversity of fungi in olive tree leaves we obtained for age as a factor influencing the fungal community (Permanova Bray-Curtis distance: Pseudo-F = 2.481, p-value = 0.001). Subsequently, SIMPER analysis showed *Pseudocercospora*, *Hyphozyma* and *Symmetrospora* as the most influential genera contributing to differences between fungal communities of plants with different ages (Table 3).

Table 3. SIMPER analysis of main fungal genera contributing to differences in age groups of olive trees.

Ages	Overall Average Dissimilarity	Most Influential OTUs / Taxonomy	Percent Contribution to Difference	Cumulative (%)
Four vs. Five	86.21 %	<i>Pseudocercospora</i>	17,07	17,07
		<i>Hyphozyma</i>	13,09	30,17
		<i>Genolevuria</i>	12,18	42,34
		<i>Taphrina</i>	6,688	49,03
		<i>Nigrospora</i>	6,018	55,05
Four vs. Six	88.72 %	<i>Pseudocercospora</i>	20,31	20,31
		<i>Hyphozyma</i>	14,64	34,95
		<i>Genolevuria</i>	10,33	45,28
		<i>Cyphellophora</i>	6,89	52,17
Four vs. Seven	80.20 %	<i>Pseudocercospora</i>	25,27	25,27
		<i>Genolevuria</i>	13,44	38,71
		<i>Carcinomyces</i>	6,4	45,11
		<i>Nigrospora</i>	5,406	50,52
Four vs. Eight	90.78 %	<i>Hyphozyma</i>	19,35	19,35
		<i>Symmetrospora</i>	19,15	38,5
		<i>Pseudocercospora</i>	11,92	50,42
Five vs. Six	88.12 %	<i>Hyphozyma</i>	20,04	20,04
		<i>Pseudocercospora</i>	18,45	38,5
		<i>Genolevuria</i>	7,648	46,14
		<i>Cyphellophora</i>	6,553	52,7
Five vs. Seven	84.58 %	<i>Pseudocercospora</i>	20,08	20,08
		<i>Hyphozyma</i>	12,7	32,78
		<i>Genolevuria</i>	11,08	43,86
		<i>Carcinomyces</i>	6,231	50,09
Five vs. Eight	87.52 %	<i>Hyphozyma</i>	22,89	22,89
		<i>Symmetrospora</i>	19,67	42,57
		<i>Pseudocercospora</i>	11,16	53,73
Six vs. Seven	86.93 %	<i>Pseudocercospora</i>	24,25	24,25
		<i>Hyphozyma</i>	14,06	38,31
		<i>Genolevuria</i>	9,089	47,4
		<i>Cyphellophora</i>	6,408	53,81
Six vs. Eight	82.11 %	<i>Hyphozyma</i>	23,97	23,97
		<i>Symmetrospora</i>	21,03	44,99
		<i>Pseudocercospora</i>	13,82	58,81
Seven vs. Eight	89.33 %	<i>Symmetrospora</i>	18,78	18,78
		<i>Hyphozyma</i>	18,03	36,8
		<i>Pseudocercospora</i>	17,76	54,57

ANCOM analysis showed that the main fungi responsible for differences between plants of different age groups were in the order Venturiales (W=221); family

Mycosphaerellaceae (W=224); and the following genera: *Hyphozyma* (W=225); *Cyphellophora* (W=223); *Erythrobasidium* (W=222); *Glomerella* (W=207).

Altitude also influenced composition and abundance of fungal communities in olive tree leaves (Bray-Curtis Pseudo-F = 2.503 p-value= 0.001). Through SIMPER analysis, the main fungi (ASVs) associated with altitudes, contributing to the differences observed, were *Hyphozyma* and *Pseudocercospora* (Table 4).

Table 4. SIMPER analysis of main fungal genera contributing to differences between altitude groups of olive plants.

Altitude	Overall Average Dissimilarity	Most Influential OTUs / Taxonomy	Percent Contribution to Difference	Cumulative (%)
A: 774 - 1000m		<i>Hyphozyma</i>	24,9	24,9
vs.	88.46 %	<i>Pseudocercospora</i>	17,72	42,61
B: 1001 - 1200m		<i>Cyphellophora</i>	12,53	55,14
A: 774 - 1000m		<i>Pseudocercospora</i>	18,83	18,83
vs.	86.42 %	<i>Hyphozyma</i>	12,97	31,8
		<i>Genolevuria</i>	10,31	42,11
C: 1201 - 1450 m		<i>Symmetrospora</i>	8,493	50,6
B: 1001 - 1200m		<i>Hyphozyma</i>	23,31	23,31
vs.	84.11 %	<i>Pseudocercospora</i>	16,69	40
C: 1201 - 1450 m		<i>Cyphellophora</i>	10,48	50,48

Label: Altitude A = 774 – 1000 m, Altitude B = 1001 -1200 m and Altitude C = 1201-1450m.

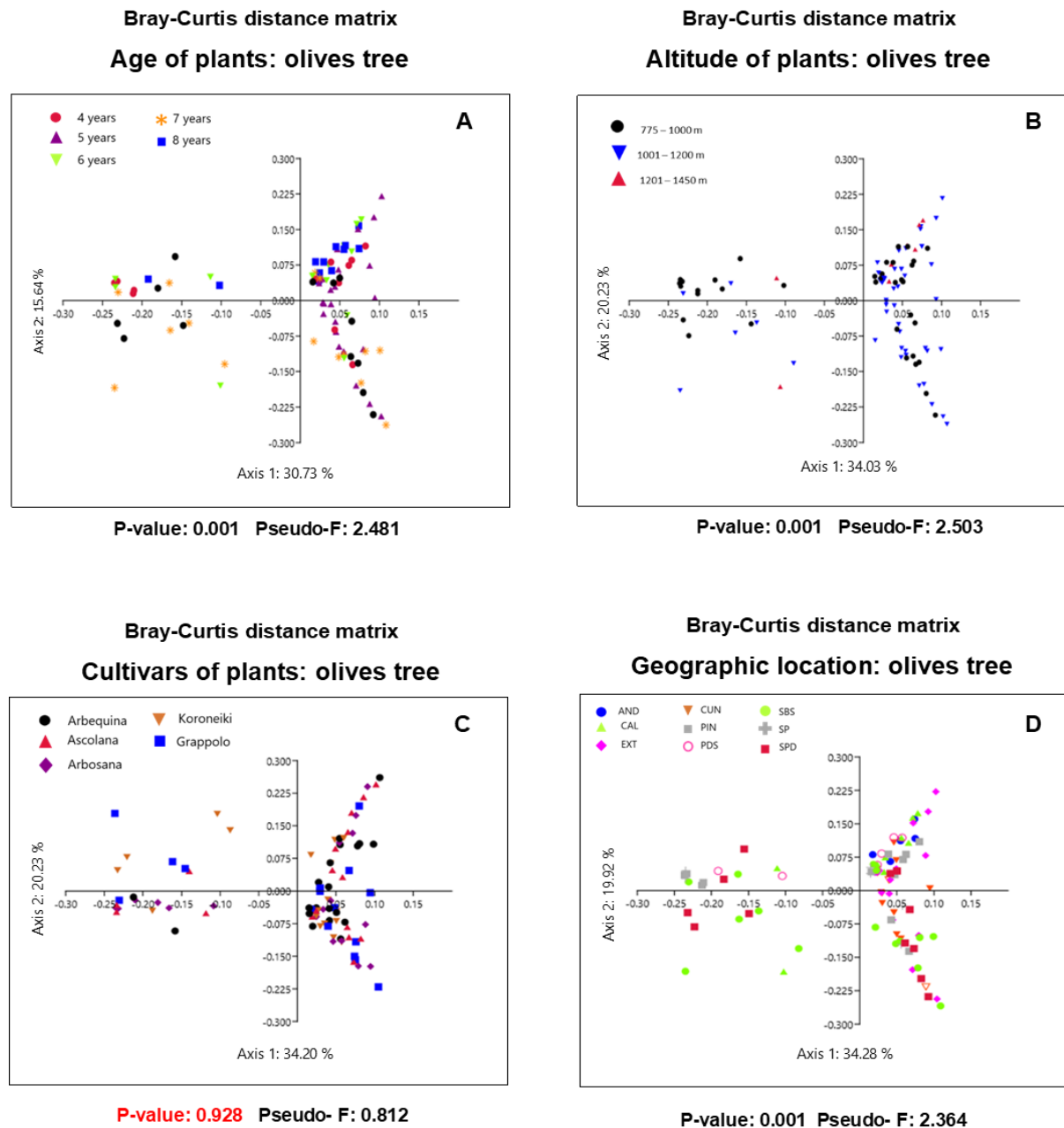
Cultivars as a factor do not influence to beta diversity abundance and composition of fungi in leaves of olive trees according (Permanova Bray-Curtis distance: Pseudo-F = 0.812, p-value = 0.928).

The as a factor geographic location influencing the diversity of fungal communities the significant values (Permanova Bray-Curtis distance: Pseudo-F = 2.364, p-value = 0.001). SIMPER analysis showed *Hyphozyma*, *Pseudocercospora*, *Symmetrospora*, and *Genolevuria* as the most influential genera contributing to dissimilarity between fungal communities between counties (Suppl.3). ANCOM analysis for beta-diversity, the main fungal taxa responsible for the differences found between counties were the family Mycosphaerellaceae (W=222) and the genera *Hyphozyma* (W=225); *Cyphellophora* (W=225); *Symmetrospora* (W=224); *Erythrobasidium* (W=223); *Glomerella* (W=223), *Sporobolomyces* (W=216); *Didymella* (W=205) and unidentified fungi (W=211).

The principal coordinates analysis (PCoA) with Bray-Curtis distance matrix for factors affecting the composition of fungal communities revealed not significant influence

only for cultivar, but the factors as age, altitude and geographic location were important influencing the abundance and composition of fungi in leaves olive trees (Figure 4).

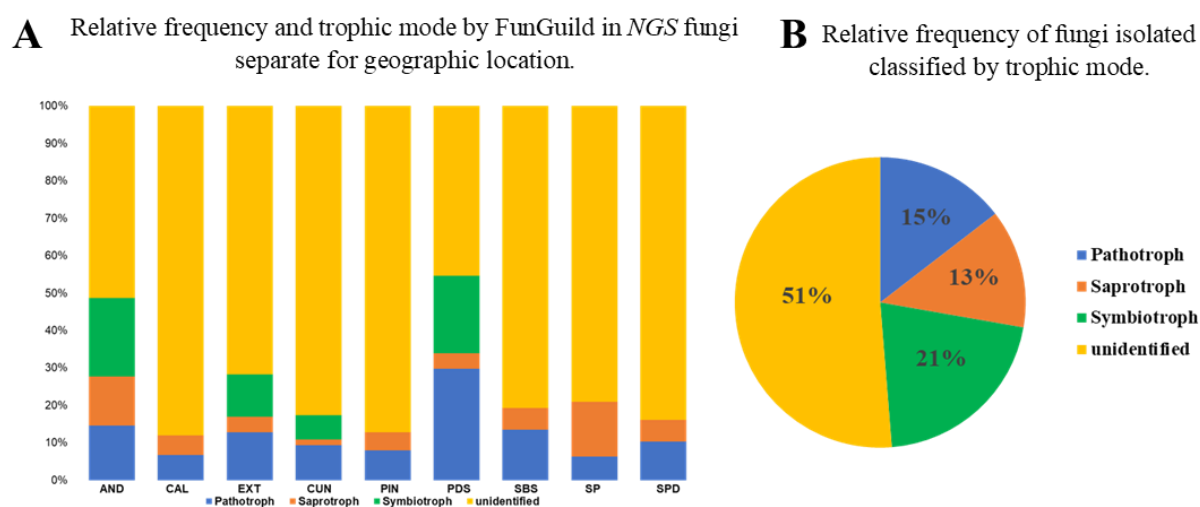
Figure 4. Beta diversity data with Principal coordinates analysis (PCoA) with Bray-Curtis distance illustrating fungal community structure among leaves of the olive tree. **A.** PCoA for age of trees, each color represents the one different age. **B.** PCoA for altitude of farms collected, each color represents the one different scale of altitude. **C.** PCoA for cultivar each color represents different cultivars of olive trees. **D.** PCoA for geographic location influencing in communities bacterial, each color represents different farms, the abbreviations are of the municipalities of state São Paulo were: Cunha (CUN), Pinhalzinho (PIN), São Pedro (SPD), Pilar do Sul (PDS), São Bento do Sapucaí (SBS) and São Paulo (SP). In the state of Minas Gerais, properties were located in: Extrema (EXT), Andradas (AND) and Caldas (CAL). The statistics highlighted in red show p-values greater than 0.05.



Trophic mode of endophytic fungi

According to the FunGuild database, the endophytic fungi could be assigned to four trophic modes: pathotroph, saprotroph, symbiotroph and unidentified for isolated fungi. The most common trophic mode was unidentified (51%) followed by symbiotrophic (21%), pathotrophic (15%) and saprotroph with 13%, (Figure 5 B). In all counties, the pathotrophs were predominant with frequencies between 45 to 80% (Figure 5A).

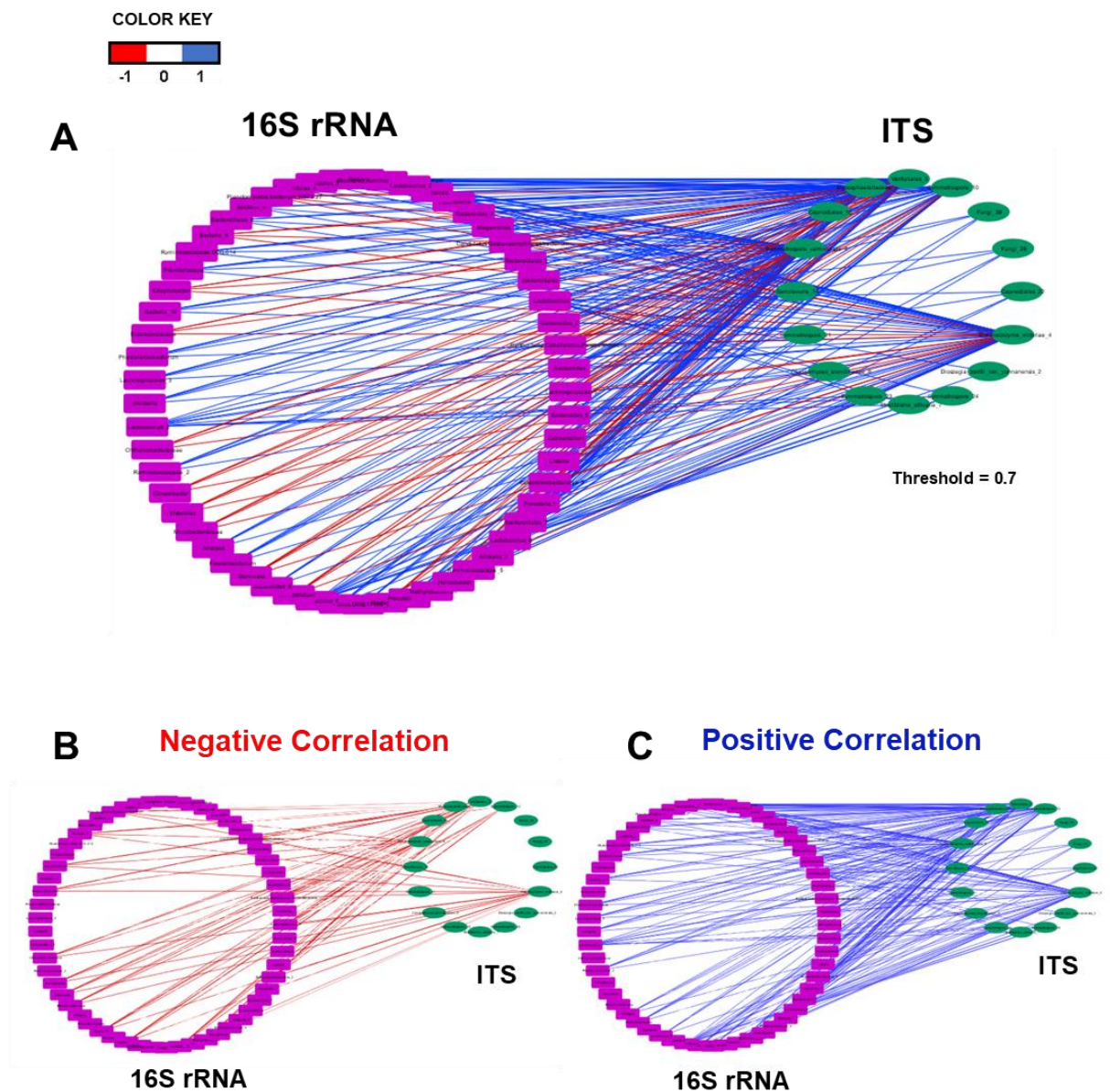
Figure 5. Trophic mode of endophytic fungi from leaves of olive trees according to the FunGuild database. **A** - Relative frequencies of the trophic modes by counties. **B** - Overall relative frequencies of trophic modes.



Interactions between bacterial and fungal endophytes communities

Besides the preliminary analyses of community diversity and composition, a network was constructed using only statistically significant correlations ($p \geq 0.05$). Positive correlations were found between bacteria and fungi more frequently than negative ones (Figure 6).

Figure 6 **A**- Analysis of correlation between bacterial (rectangle violet) and fungal (oval green) communities, **B**- Negative Correlation in highligh and **C**- Positive Correlation in highligh.



The Genbank searches were performed to identify bacterial and fungal taxonomic groups that were involved in the positive (Figure 7) and negative correlations (Figure 8).

Figure 7. Phylogenetic trees of bacterial and fungal ASVs that showed negative correlation in network analysis. ASVs with names in colored letters are from this study and in black letters are from the Genbank. **A** – Bacterial ASVs (substitution model TIM3e+G4). – Fungal ASVs (substitution model K2P + I). The pink boxes highlighted in the images, refers to the Genbank sequences that had information about the host or isolated location and that were correlated with plant materials e.g. wood, leaf, fruit, roots, etc.



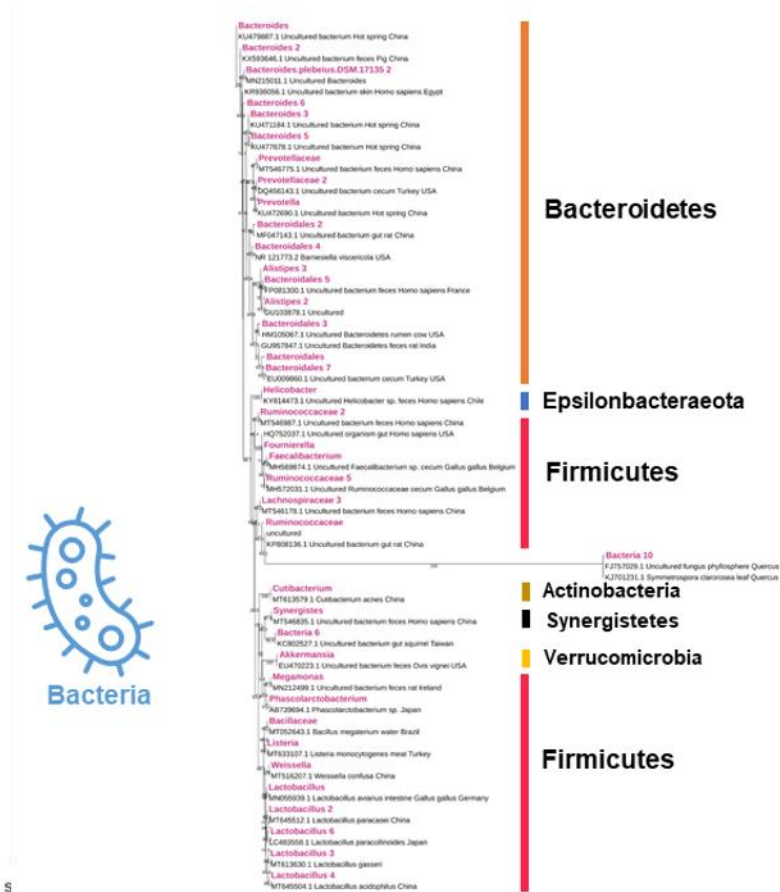
The involved in negative correlations, bacteria such as *Conexibacter* [ASV75], *Burkholderia* [ASV3], *Betaproteobacteriales_2* [ASV125], *Elsterales* [ASV76], *Methylobacterium* [ASV108] were similar to bacteria from leaf, rhizosphere and soil. Also, bacteria such as *Planctomycetia* [ASV42], *Edaphobacter* [ASV54], *Gemmata* [ASV85], *Bacteria_15* [ASV100] were associated with bacteria from soil and rhizosphere. Fungi involved in negative correlations such as *Venturiales_3* [ASV322] and *Mycosphaerellaceae_7* [ASV361] were similar to fungi found in olive trees and other plants. Other fungi such as *Symmetrospora_10* [ASV195], *Symmetrospora vermiculata_8*

[ASV417] e *Vishniacozyma victoriae*_4 [ASV628] were similar to fungi found in maize, sugarcane and rice.

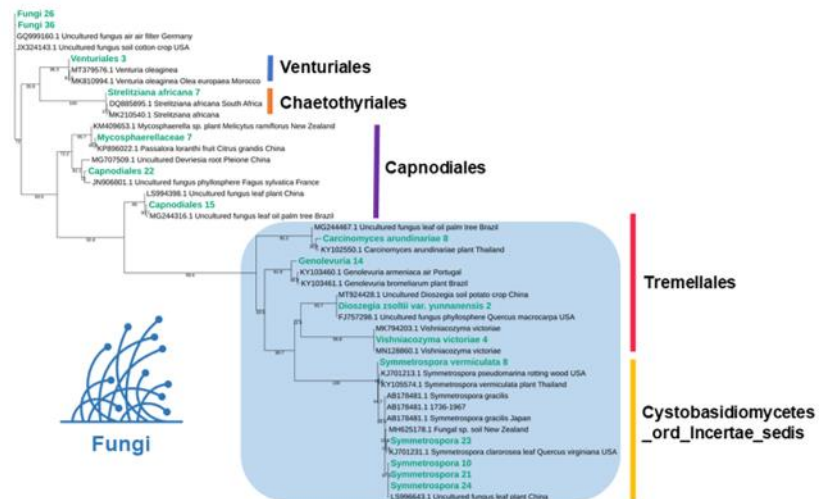
Thirty-nine bacterial ASVs involved in positive correlations were similar to strains commonly found in gut, intestine and feces of vertebrates such as cow, chicken, mouse and *Homo sapiens*, not showing specificity to a host species. Among the 16 fungal ASVs involved in positive correlations, most were similar to species associated with plants.

Figure 8. Phylogenetic trees of bacterial and fungal ASVs that showed positive correlation in network analyses. ASVs with names in colored letters are from this study and in black letters are from the Genbank. **A** – Bacterial ASVs (substitution model TIM2e+I+G4). **B** – Fungal ASVs (substitution model TIM3e+G4). The blue box highlighted in the image, refers to the Genbank sequences that had information about the host or isolated location and that were correlated with plant materials e.g. soil, leaf, fruit, roots, parts of plants etc.

A



B



Fungi of Order Tremellales in highlighted (*Carcinomyces arundinariae*_8 [ASV549]; *Genolevuria* [ASV466]; *Dioszegia* [ASV570]; *Vishniacozyma victoriae*_4 [ASV628]) are found in phyllosphere of maize and olive trees and three ASVs of the genus *Symmetrospora* (*Symmetrospora*_21 [ASV534], *Symmetrospora*_24[ASV563] e *Symmetrospora vermiculata*_8 [ASV417]) are also found in the phyllosphere of maize and olive trees and in mangrove areas.

The relation among fungi how plant pathogens in Order Venturiales (*Venturia oleaginea*, syn. *Fusicladium oleagineum*) that are considered important leaf pathogen of olive trees and in Order Capnodiales that are abundant in the plant phyllosphere. Members of family Mycosphaellaceae are leaf pathogens of important plants such as *Eucalyptus globulus* and also of olive trees.

Discussion

Culture-independent bacterial and fungal communities analyses

Many studies using 16S rRNA and ITS region sequences have improved our understanding of the relationship between microorganisms that live in association with plants. This study contribute unveils the diversity (composition and abundance) of endophytic bacterial and fungal communities in olive tree leaves. We investigated factors that may or may not influence this microbial endophytic diversity. Plant age and geographic location affected both groups of microorganisms while altitude only the fungal community.

Alpha diversity analysis demonstrated that phylum Proteobacteria was the most abundant in olive tree leaves. This finding corroborates the results obtained in other studies of the endophytic bacterial diversity in olive leaves in cultivated and wild plants (MÜLLER *et al.*, 2015) and in conventional and sustainable orchards (FAUSTO *et al.*, 2018).

Age influencing the diversity of bacterial and fungal communities

The factor age was important for both composition and abundance of bacterial and fungal communities. Previous studies revealed that age was also an important factor affecting diversity of bacterial communities in other plants such as *Pinus flexilis* (CARPER *et al.*, 2018) and *Panax ginseng* (HONG *et al.*, 2019). In *Panax ginseng*, an increase in endophytic bacterial diversity was observed in older plants, corroborating our results with olive trees. Eight years old plants have a bacterial community that is distinct from those observed in younger plants, with *Stenotrophomonas* and *Achromobacter* being the most influential bacteria contributing to dissimilarity. The genus *Stenotrophomonas* is commonly found in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana*, clover, and soybean (DELMOTTE *et al.*, 2009) and roots of rice (ZHU *et al.*, 2012). Whereas the bacteria

Achromobacter this and *Stenotrophomonas* have been reported to be present on the leaf surface of *Hedera helix* (SCHREIBER *et al.*, 2005). *Achromobacter* species are frequently found in screenings for endophytic plant growth promoting bacteria and phytoremediation (JHA, KUMAR, 2009; HO *et al.*, 2012).

The age of eight years is reported as an important period for olive trees. This can be explained by the physiology of the plant in the Southeast region of Brazil, where plants at this age and onwards are considered in the adult phase and show stability in production (Oliveira *et al.*, 2012).

The increase in richness of fungal endophytes in leaves along with the plants' age has also been reported for *Coccoloba cereifera* (SANCHEZ-AZOFEIFA *et al.*, 2012). The community of endophytic fungi was also changed for different ages and localities of *Calotropis procera* leaves, and most of the endophytes were found in senescent leaves (NASCIMENTO *et al.*, 2015). According to Skaltsas *et al.*, (2019), host developmental stage is a determinant factor of endophytes community of tropical plants and differences such as composition of nutrients in the phloem may cause adaptations of the endophytic community to the developmental stage.

Altitude influencing the diversity of bacterial and fungal communities

In this study, altitude was not a significant factor influencing the bacterial community in olive trees, contrasting to the study of Carper *et al.*, (2018) that has shown significantly different endophytic bacterial communities in the leaves of mature trees across an elevation gradient. In quinoa plants, bacterial and fungal communities showed significant differences between rhizosphere, roots and leaves, and alpha diversity increased along with altitudinal elevation (CAI *et al.*, 2020).

In coffee plants, altitude, soil parameters, or season were of minor importance in the diversity of septate black fungi isolated from roots (BONFIM *et al.*, 2016). In another study with coffee plants, richness, evenness, and diversity of the mycobiome and bacteriome were higher in soil than in fruits, independently of altitude (VELOSO *et al.*, 2020).

Geography influencing the diversity of bacterial and fungal communities

The geography is often mentioned as an impacting factor on the diversity of endophytic microorganisms in plants. Examples of this effect were reported for *Hevea*

and *Micrandra* in three reserves in the Peruvian Amazon region (SKALTSAS *et al.*, 2019); olive trees in Italy, Spain, Greece, Portugal, Tunisia, Syria and Morocco studied by (MÜLLER *et al.*, 2015) and three quinoa fields in China (CAI *et al.*, 2020). Geography also influenced the bacterial and fungal community of two species of Maple trees in Germany (WEMHEUER *et al.*, 2019). These results corroborate our results that showed community differences between plants from different locations of the states of São Paulo and Minas Gerais.

Trophic mode of endophytic fungi

In recent years, studies about ecology of fungal communities using the FunGuild database has been employed in order to understand niches and behavior of these organisms (MARTINEZ-DIZ *et al.*, 2019; PANG *et al.*, 2019; SKALTSAS *et al.*, 2019). Our results showed that the most abundant trophic mode was unidentified followed by symbiotrophic, pathotrophic and saprotrophic. That unidentified trophic mode was the most prevalent demonstrate that FunGuild database is still largely incomplete. As example, *Symmetrospora* was very frequent in our samples but it is classified as unknown. Nevertheless, the culture-independent method detected many symbiotrophic fungi that were not recovered by isolation in culture medium (OLIVEIRA *et al.*, *in prep.*). According to Nguyen *et al.*, (2016), symbiotroph fungi are those that receive nutrients by exchanging resources with host cells. Bickford *et al.*, (2018) the most frequent trophic modes were patotrophs, saprotrophs and symbiotrophs among fungi associated with roots of *Phragmites australis*. The most frequent modes among endophytic fungi found in *Hevea* and *Micrandra* were saprotrophs e symbiotrophs (SKALTSAS *et al.*, 2019)

Martinez-Diz *et al.*, (2019) have found in the endorizosphere of grapevines mostly symbiotrophs, followed by pathotrophs, unidentified and saprotrophs, while in bulk soil the order was saprotroph, unidentified, symbiotroph e pathotroph. These authors suggested that root tissues may act as barrier for colonization by fungi. (MARTÍNEZ-DIZ *et al.*, 2019). Their results differed from what has been found in the current study, in which unidentified and symbiotroph were more frequent, possibly because leaf endophytes were sampled.

Interactions between fungi and bacteria

Correlation analyses showed that positive correlations between fungi and bacteria were more frequent than negative ones. Bacteria involved in positive correlations were mostly found in Bacteroidetes e Firmicutes, and showed similarity to species found in the gut, intestine and feces of vertebrates, as part of animal microbiota (CHEN *et al.*, 2019; FOUTS *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2010). These bacteria were also the most frequently found in roots of dwarf wheat (KAVAMURA *et al.*, 2020) and phyllosphere of olive trees (MÜLLER *et al.*, 2015).

Bacteria involved in negative correlations were mostly from Proteobacteria e Actinobacteria that are also predominant in roots of *Panax ginseng* (HONG *et al.*, 2019). Genus *Methylobacterium* can be found on the surface of rice leaves (SANJENBAM *et al.*, 2020). Some species of this genus, such as *M. mesophilicum* can inhibit growth in vitro of *Xylella fastidiosa* an important citrus pathogen (LACAVA *et al.*, 2004) and also of olive trees in Brazil (COLETTA-FILHO *et al.*, 2016). Genera *Burkholderia* e *Conexibacter* were also found in the rizhosphere of sweet potato (MARQUES *et al.*, 2014). Fungi in Order Venturiales and family Mycosphaerellaceae were also frequently found among those involved in negative correlations, as well as genus *Symmetrospora* (INTO *et al.*, 2020; NICOLETTI *et al.*, 2020; SRISUK *et al.*, 2019).

This is the first study of endophytic fungi and bacteria of olive trees that used NGS in Brazil. We observed that composition and abundance of the community of microorganisms in leaves of olive trees can be influenced by factors such as altitude, age and location, but not by cultivar. Also, complex interactions between fungi and bacteria revealed both positive and negative correlations.

References

- ARAÚJO, Welington L.; MARCON, Joelma; MACCHERONI, Walter; VAN ELSAS, Jan Dirk; VAN VUURDE, Jim W. L.; AZEVEDO, João Lúcio. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/68/10/4906>.
- AZEVEDO, João Lúcio; WALTER MACCHERONI JR.; PEREIRA, Jose Odair; ARAÚJO, Welington De. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02827580510008248>.
- BICKFORD, Wesley A.; GOLDBERG, Deborah E.; KOWALSKI, Kurt P.; ZAK, Donald R.

Root endophytes and invasiveness: no difference between native and non-native *Phragmites* in the Great Lakes Region. **Ecosphere**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e02526, 2018. DOI: 10.1002/ecs2.2526. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ecs2.2526>.

BOLYEN, Evan et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.

BONFIM, Joice Andrade; VASCONCELLOS, Rafael Leandro Figueiredo; BALDESIN, Luiz Fernando; SIEBER, Thomas N.; CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 20, p. 202–210, 2016. DOI: 10.1016/j.funeco.2016.01.008.

CAI, Zhiquan; WANG, Xiaobo; BHADRA, Sreetama; GAO, Qi. Distinct factors drive the assembly of quinoa-associated microbiomes along elevation. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 448, n. 1–2, p. 55–69, 2020. DOI: 10.1007/s11104-019-04387-1.

CALLAHAN, Benjamin J.; MCMURDIE, Paul J.; ROSEN, Michael J.; HAN, Andrew W.; JOHNSON, Amy Jo A.; HOLMES, Susan P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016. DOI: 10.1038/nmeth.3869. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nmeth.3869>.

CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. DOI: 10.1038/ismej.2012.8. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ismej20128>.

CARPER, Dana L.; CARRELL, Alyssa A.; KUEPPERS, Lara M.; FRANK, A. Carolin. Bacterial endophyte communities in *Pinus flexilis* are structured by host age, tissue type, and environmental factors. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 428, n. 1–2, p. 335–352, 2018. DOI: 10.1007/s11104-018-3682-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-018-3682-x>.

CHEN, Yuan; NI, Jiajia; LI, Hongwei. Effect of green tea and mulberry leaf powders on the gut microbiota of chicken. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-1822-z.

COLETTA-FILHO, Helvécio Della; FRANCISCO, Carolina Sardinha; ROBERTO, João; LOPES, Spotti; DE OLIVEIRA, Adelson Francisco. First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. **Phytopathologia Mediterranea**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 130–135, 2016. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-17259.

DE MELO PEREIRA, Gilberto Vinícius; MAGALHÃES, Karina Teixeira; LORENZETTI, Emi Rainildes; SOUZA, Thiago Pereira; SCHWAN, Rosane Freitas. A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 405–417, 2012. DOI: 10.1007/s00248-011-9919-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-011-9919-3>.

DELMOTTE, Nathanaël; KNIEF, Claudia; CHAFFRON, Samuel; INNEREBNER, Gerd; ROSCHITZKI, Bernd; SCHLAPBACH, Ralph; VON MERING, Christian; VORHOLT, Julia A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 38, p. 16428–16433, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0905240106.

DISSANAYAKE, Asha J. et al. Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 85–107, 2018. DOI: 10.1007/s13225-018-0399-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0399-3>.

FAUSTO, Catia; MININNI, Alba N.; SOFO, Adriano; CRECCHIO, Carmine; SCAGLIOLA,

Marina; DICHIO, Bartolomeo; XILOYANNIS, Cristos. Olive orchard microbiome: characterisation of bacterial communities in soil-plant compartments and their comparison between sustainable and conventional soil management systems. **Plant Ecology & Diversity**, [S. l.], v. 11, n. 5–6, p. 597–610, 2018. DOI: 10.1080/17550874.2019.1596172. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1596172>.

FOUTS, Derrick E.; SZPAKOWSKI, Sebastian; PURUSHE, Janaki; TORRALBA, Manolito; WATERMAN, Richard C.; MACNEIL, Michael D.; ALEXANDER, Leeson J.; NELSON, Karen E. Next Generation Sequencing to Define Prokaryotic and Fungal Diversity in the Bovine Rumen. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 11, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0048289.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 113–118, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>.

GONZALEZ, Ignacio; DÉJEAN, Sébastien; MARTIN, Pascal; BACCINI, Alain. CCA : An R Package to Extend Canonical Correlation Analysis. **Journal of Statistical Software**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 1–14, 2008. DOI: 10.18637/jss.v023.i12. Disponível em: <http://www.jstatsoft.org/v23/i12/>.

HO, Ying Ning; MATHEW, Dony Chacko; HSIAO, Shu Chuan; SHIH, Chun Hao; CHIEN, Mei Fang; CHIANG, Hsing Mei; HUANG, Chieh Chen. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 219–220, p. 43–49, 2012. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.03.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.035>.

HONG, Chi Eun; KIM, Jang Uk; LEE, Jung Woo; BANG, Kyong Hwan; JO, Ick Hyun. Metagenomic analysis of bacterial endophyte community structure and functions in Panax ginseng at different ages. **3 Biotech**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 300, 2019. DOI: 10.1007/s13205-019-1838-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1838-x>.

INTO, Parichat; KHUNNAMWONG, Pannida; JINDAMORAGOT, Sasitorn; AM-IN, Somjit; INTANOO, Wanwilai; LIMTONG, Savitree. Yeast associated with rice phylloplane and their contribution to control of rice sheath blight disease. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8030362.

JHA, Prabhat; KUMAR, Ashok. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 179–188, 2009. DOI: 10.1007/s00248-009-9485-0.

KAVAMURA, Vanessa N.; ROBINSON, Rebekah J.; HUGHES, David; CLARK, Ian; ROSSMANN, Maïke; MELO, Itamar Soares De; HIRSCH, Penny R.; MENDES, Rodrigo; MAUHLIN, Tim H. Wheat dwarfing influences selection of the rhizosphere microbiome. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1452, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-58402-y. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-58402-y>.

KNIEF, Claudia. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 5, n. MAY, p. 1–23, 2014. DOI: 10.3389/fpls.2014.00216. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00216/abstract>.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 55–59, 2004. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01543.x.

LEE, Steven B.; TAYLOR, John W. ISOLATION OF DNA FROM FUNGAL MYCELIA AND

SINGLE SPORES. In: **PCR Protocols**. [s.l.] : Elsevier, 1990. p. 282–287. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X>.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W256–W259, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz239. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/W1/W256/5424068>.

MARQUES, Joana M.; DA SILVA, Thais F.; VOLLU, Renata E.; BLANK, Arie F.; DING, Guo Chun; SELDIN, Lucy; SMALLA, Kornelia. Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 424–435, 2014. DOI: 10.1111/1574-6941.12313.

MARTÍNEZ-DIZ, María del Pilar; ANDRÉS-SODUPE, Marcos; BUJANDA, Rebeca; DÍAZ-LOSADA, Emilia; EICHMEIER, Ales; GRAMAJE, D. Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 41, p. 234–244, 2019. DOI: 10.1016/j.funeco.2019.07.003.

MIRARAB, Siavash; NGUYEN, Nam; WARNOW, Tandy. SEPP: SATé-enabled phylogenetic placement. In: **Biocomputing 2012**. 2012. p. 247–258.

MÜLLER, Henry; BERG, Christian; LANDA, Blanca B.; AUERBACH, Anna; MOISSEL-EICHINGER, Christine; BERG, Gabriele. Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus antagonists* colonize Mediterranean olive trees. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. MAR, p. 1–9, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00138. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00138/abstract>.

NASCIMENTO, T. L.; OKI, Y.; LIMA, D. M. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G. Wilson; SOUZA-MOTTA, C. M. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 14, p. 79–86, 2015. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.10.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.004>.

NGUYEN, Nhu H.; SONG, Zewei; BATES, Scott T.; BRANCO, Sara; TEDERSOO, Leho; MENKE, Jon; SCHILLING, Jonathan S.; KENNEDY, Peter G. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 20, p. 241–248, 2016. DOI: 10.1016/j.funeco.2015.06.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504815000847>.

NICOLETTI, Rosario; DI VAIO, Claudio; CIRILLO, Chiara. Endophytic Fungi of Olive Tree. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1321, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8091321. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1321>.

PANG, Ziqin; TAYYAB, Muhammad; KONG, Chuibao; HU, Chaohua; ZHU, Zhisheng; WEI, Xin; YUAN, Zhaonian. Liming Positively Modulates Microbial Community Composition and Function of Sugarcane Fields. **Agronomy**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 808, 2019. DOI: 10.3390/agronomy9120808. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/12/808>.

QIN, Junjie et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, [S. l.], v. 464, n. 7285, p. 59–65, 2010. DOI: 10.1038/nature08821.

ROHART, Florian; GAUTIER, Benoît; SINGH, Amrit; LÊ CAO, Kim-Anh. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. **PLOS Computational Biology**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. e1005752, 2017. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005752. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>.

SANCHEZ-AZOFEIFA, Arturo; OKI, Yumi; FERNANDES, G. Wilson; BALL, Ronald Aaron; GAMON, John. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees - Structure and Function**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 291–299, 2012. DOI: 10.1007/s00468-011-0591-5.

SANJENBAM, Pratibha; BUDDIDATHI, Radhika; VENKATESAN, Radhika; SHIVAPRASAD, P. V.; AGASHE, Deepa. Phenotypic diversity of *Methylobacterium* associated with rice landraces in North-East India. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 1–25, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0228550. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0228550>.

SCHREIBER, Lukas; KRIMM, Ursula; KNOLL, Daniel; SAYED, Mohamed; AULING, Georg; KROPPESTEDT, Reiner M. Plant-microbe interactions: Identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. **New Phytologist**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 589–594, 2005. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01343.x.

SKALTSAS, Demetra N.; BADOTTI, Fernanda; VAZ, Aline Bruna Martins; SILVA, Felipe Ferreira Da; GAZIS, Romina; WURDACK, Kenneth; CASTLEBURY, Lisa; GÓES-NETO, Aristóteles; CHAVERRI, Priscila. Exploration of stem endophytic communities revealed developmental stage as one of the drivers of fungal endophytic community assemblages in two Amazonian hardwood genera. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 12685, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-48943-2. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-48943-2>.

SRISUK, N.; NUTARATAT, P.; SURUSSAWADEE, J.; LIMTONG, S. Yeast Communities in Sugarcane Phylloplane. **Microbiology (Russian Federation)**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 353–369, 2019. DOI: 10.1134/S0026261719030135.

TEDERSOO, Leho et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, [S. l.], v. 346, n. 6213, p. 1256688, 2014. DOI: 10.1126/science.1256688. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaa1185>.

THOMPSON, Luke R. et al. A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. **Nature**, [S. l.], v. 551, n. 7681, p. 457–463, 2017. DOI: 10.1038/nature24621.

TRIFINOPOULOS, Jana; NGUYEN, Lam-Tung; VON HAESELER, Arndt; MINH, Bui Quang. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw256. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw256>.

VELOSO, Tomás Gomes Reis; DA SILVA, Marliane de Cássia Soares; CARDOSO, Wilton Soares; GUARÇONI, Rogério Carvalho; KASUYA, Maria Catarina Megumi; PEREIRA, Lucas Louzada. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-71309-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71309-y>.

WEMHEUER, Franziska; WEMHEUER, Bernd; DANIEL, Rolf; VIDAL, Stefan. Deciphering bacterial and fungal endophyte communities in leaves of two maple trees with green islands. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 14183, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-50540-2. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-50540-2>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: **PCR Protocols**. [s.l.] : Elsevier, 1990. v. 2p. 315–322. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.

ZHU, Bo; LIU, H.; TIAN, W. X.; FAN, X. Y.; LI, Bin; ZHOU, X. P.; JIN, G. L.; XIE, G. L. Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* RR-10, Isolated as an Endophyte from Rice Root. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 194, n. 5, p. 1280–1281, 2012. DOI: 10.1128/JB.06702-11. Disponível em: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.06702-11>.

Artigo 2

Diversity of fungi endophytic associated with leaves in olive tree and your relationship with preference of leaf-cutting ants.

Amanda Aparecida de Oliveira ^{1,2}, Ricardo Harakava ², Ana Eugênia de Carvalho Campos ² & Odair Correa Bueno ¹.

1-São Paulo State University (UNESP) – Institute of Biosciences - Campus Rio Claro, Departamento de Biologia Geral e Aplicada e Centro de Estudos de Insetos Sociais. Avenida 24A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro - SP, Brazil.

2- Biological Institute of São Paulo – Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, 04014-002, São Paulo -SP, Brazil.

Corresponding author: Amanda A. de Oliveira

São Paulo State University

Departamento de Biologia Geral e Aplicada e Centro de Estudos de Insetos Sociais.

Avenida 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro - SP.

Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil

Email: oliveira.amandah@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-7283-2752

Acknowledgment

UNESP, Biological Institute of Sao Paulo and CAPES finance code 001 thank the grant to AAO.

Abstract

The olive growing showed an increasing expansion in states like São Paulo and Minas Gerais in the Southeast region of the country, mainly in the Serra da Mantiqueira. It is a plant of Mediterranean origin, there are several challenges in implementing this culture in Brazil, with leaf-cutting ants being one of the main ones. These insect pests cause immense damage due to defoliation and plant death in severe attacks. Currently, the control for leaf-cutting ants is made with toxic baits, however, it is known that these assets can cause damage to the environment and humans. Thus, an alternative for the control would be the use of endophytic fungi that are those that live inside plant tissues without causing apparent damage to their hosts. These microorganisms can benefit plants as protection against herbivores. Thus, knowing the diversity of endophytic fungi associated with olive leaves is important. It is worth mentioning that several factors influence the foraging of leaf-cutting ants such as age and leaf tenacity and abundance of endophytes, among others. However, for olive growing, little is known about what factors contribute to this choice. Thus, testing the cutting preference among the most common cultivars in cultivation in the southeastern region of Brazil is necessary. The objectives of this study were to identify endophytic fungi associated with *Olea europaea* leaves by the culture-dependent method; identify the trophic mode using the FunGuild program and verify the cutting preference for leaf-cutting ants (*Atta sexdens*) among the main olive cultivars planted on farms in São Paulo and Minas Gerais. In all, branches of 93 trees were collected from nine properties, divided into six in the state of São Paulo and three in Minas Gerais. The leaves were superficially disinfected in P.D.A plates. After obtaining pure colonies of the isolates, they were grouped into morphotypes. One specimen of each morphotype was subjected to molecular identification using the ITS intergenic region and sequencing by the Sanger method. For the preference test, four olive cultivars were used with six replications under laboratory conditions. The results obtained were 800 fungal isolates grouped in 191 morphotypes. In all, 38 genera of fungi were identified, 32 of these for the first time in olive trees grown in the country. The most abundant trophic level was the pathotrophic one, moreover, differently from what was expected, there was no significant result on the cut preference among the different olive cultivars. Therefore, further studies are needed to understand the effect of these endophytic fungi on the collection preference for ants and to test other potential uses. In this work, the greatest diversity of fungi associated with olive trees was ever identified in Brazil.

Key-words

Atta sexdens, endophytes, crop olive, diversity

Resumo

A olivicultura demonstra uma crescente expansão em estados como São Paulo e Minas Gerais na região Sudeste do país principalmente na Serra da Mantiqueira. Por ser uma planta de origem mediterrânea existem diversos desafios na implantação dessa cultura no Brasil, sendo as formigas-cortadeiras um dos principais. Esses insetos pragas causam imensos prejuízos devido a desfolha e morte de plantas quando em ataques severos. Atualmente o controle para formigas-cortadeiras são a base de iscas tóxicas granuladas, porém sabe-se que esses ativos podem acarretar em danos ao meio ambiente e ao ser humano. Dessa forma, uma alternativa para o controle seria a utilização de fungos endofíticos que são aqueles que vivem dentro de tecidos das plantas sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros. Esses microrganismos podem beneficiar as plantas como proteção contra herbívoros. Assim, conhecer a diversidade de fungos endofíticos associada a folhas de oliveira se faz importante. Vale ressaltar que diversos fatores influenciam o forrageamento das formigas-cortadeiras como idade e tenacidade das folhas e abundância de endofíticos, entre outros. No entanto, para a olivicultura, pouco se conhece sobre quais fatores contribuem para essa escolha. Desse modo, testar a preferência de corte entre as cultivares mais comuns em cultivo na região sudeste do Brasil torna-se necessário. Os objetivos deste estudo foram identificar fungos endofíticos associadas as folhas de *Olea europaea* pelo método dependente de cultivo; identificar o modo trófico utilizando o programa FunGuild e verificar a preferência de corte por formigas-cortadeiras (*Atta sexdens*) entre as principais cultivares de oliveira plantadas em fazendas de São Paulo e Minas Gerais. Ao todo, foram coletados ramos de 93 árvores em nove propriedades, divididas em seis no estado de São Paulo e três em Minas Gerais. As folhas foram desinfestadas superficialmente e plaqueadas em meio de cultura B.D.A. Após a obtenção de colônias puras dos isolados, os mesmos foram agrupados em morfotipos. Um exemplar de cada morfotipos foi submetido a identificação molecular utilizando a região intergênica ITS e sequenciamento pelo método Sanger. Para o teste de preferência, foram utilizadas quatro cultivares de oliveiras com seis repetições em condições laboratoriais. Os resultados obtidos foram 800 isolados fúngicos agrupados em 191 morfotipos. Ao todo, 38 gêneros de fungos foram identificados, 32 destes pela primeira vez em oliveiras cultivadas no país. O nível trófico mais abundante foi o patotrófico, além disso, diferentemente do que se esperava não houve resultado significativo sobre a preferência de corte entre as diferentes cultivares de oliveira. Portanto, faz-se necessário novos estudos para compreender o efeito desses fungos endofíticos sobre a preferência de coleta pelas formigas e testar outros potenciais usos. Neste trabalho, foi obtida a maior diversidade de fungos associadas a oliveiras já identificada no Brasil.

Palavras-chaves

Atta-sexdens, endófitos, olivicultura, diversidade,

Introduction

Endophytes are microorganisms that live in plant tissue for at least part of its life cycle without causing any harm to the host (LE COCQ *et al.* 2017; VAN OVERBEEK; SAIKKONEN, 2016), however, there is controversy in the literature and definition, where

some authors suggest that endophyte should refer only to its habitat and not its function (HARDOIM *et al.*, 2015). The term “endophyte” has commonly been used for fungi living inside plants, but later researchers realized that interior parts of plants could be colonized by bacteria as well (CHANWAY, 1996; HALLMANN *et al.*, 1997; HARDOIM *et al.*, 2015). A usual definition for endophytes came from a practical description - Hallmann *et al.*, (1997) stated that endophytes are “. . . those (bacteria) that can be isolated from surface disinfected plant tissue or extracted from within the plant, and that do not visibly harm the plant”. In this study, we use the concept according to Hardoim *et al.*, (2015), because it includes all types of microorganisms, whether they are pathogenic or non-pathogenic, bacteria or fungi.

The endophytic microbial community is influenced by numerous factors such as plant age, geography, altitude, soil, cultivars, climate and even different parts of the host such as roots and leaves (BERGELSON *et al.*, 2019; CARPER *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2015; SILES; MARGESIN, 2017; WEMHEUER *et al.*, 2019). One plant that has increased its crops areas in South America but little is known about the diversity of the endophytic community is the olive tree (*Olea europaea*). Olive plantations in Brazil has suffered from the attack of an important pest insect, the leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (OLIVEIRA *et al.*, 2012), that cause damages by defoliation just as on other crops of economic importance such as *Pinus* and *Eucalyptus* (ZANETTI *et al.*, 2014). Currently, the control for this insect is done with toxic baits mainly sulfluramid and fipronil (BRITTO *et al.*, 2016), however this form of long-term control can be harmful to the environment and human health (LÖFSTEDT GILLJAM *et al.*, 2016). For this reason, research on alternative methods for control or with deterrent effects is necessary and knowledge of the endophytic microorganisms associated with olive trees is a first step towards understanding this type of association and future applications.

Isolation of endophytic fungi enables to explore their use in biotechnological processes. Surveys that infer the trophic level and guilds for fungi have been conducted to explore functional diversity of the community in environments such as soil and leaves (PANG *et al.*, 2019; SKALTSAS *et al.*, 2019; TEDERSOO *et al.*, 2014). A tool that can be used to taxonomically parse fungal OTUs is FunGuild, this database enables to find trophic levels, guilds and mode of fungal growth (NGUYEN *et al.*, 2016).

The concepts that we used in this article were referred to as trophic modes in Nguyen *et al.*, (2016): (1) pathotroph = receiving nutrients by harming host cells (including phagotrophs); (2) symbiotroph = receiving nutrients by exchanging resources with host cells; and (3) saprotroph = receiving nutrients by breaking down dead host cells. The authors stated

that “while these trophic definitions may differ among fields (e.g. pathology vs. ecology), these broadly defined trophic modes work well in fungal community ecology as they reflect the major feeding habits of fungi”.

Overall, numerous studies have been done on microbial communities in plants (CARPER *et al.*, 2018; WEMHEUER *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2019), but few studies have explored the community of endophytes associated with olive trees, particularly in a recently introduced area such as the subtropical region of Brazil, thus demonstrating the relevance of our study. Therefore, to better understand this endophytic diversity our goal were: 1) to identify endophytic fungi by culture-dependent methods; 2) to verify preference of leaf-cutting ants (*Atta sexdens*) between the main cultivars of olive trees planted in farms in São Paulo and Minas Gerais states and 3) to predict the trophic modes based on FunGuild database.

Materials and Methods

Study site and sampling leaves of olive trees

The study was conducted on farms located in the southeastern region of Brazil. In the state of São Paulo and Minas Gerais, six and three properties were sampled, respectively. The counties collected in the state of São Paulo were: Cunha (CUN), Pinhalzinho (PIN), São Pedro (SPD), Pilar do Sul (PDS), São Bento do Sapucaí (SBS) and São Paulo (SP); and in the state of Minas Gerais were: Extrema (EXT), Andradas (AND) and Caldas (CAL). Three trees were randomly selected from each cultivar available in each farm, totaling 93 trees sampled. From these, eight branches with healthy leaves were collected from each plant and a pool was made for each cultivar present in the farm. The samples were placed in sterile plastic bags, labeled, and transported to the lab in a styrofoam box cooled with ice substitute.

Isolation of endophytic fungi

Leaf surfaces were washed with mild detergent and running tap water, and then air-dried. Before surface sterilization, leaves were cut into small fragments using sterile surgical blades. Leaf fragments were surface sterilized by successively immersion in 70% ethanol for 5 min, 2% sodium hypochloride for 5 min, 70% ethanol for 30 s and three washes in autoclaved water, according to Araújo *et al.*, (2002). The surface-disinfected fragments were placed on potato dextrose agar (PDA) (supplemented with 500 mg/L pentabiotic to suppress bacterial growth) and incubated at 25°C until the growth of endophytic fungi was discerned.

Hyphal tips originating from plant segments were transferred to PDA plates without antibiotics. Each fungal isolate was checked for purity and transferred to new medium by the hyphal tip method. For each olive tree, five plates with 10 sterilized leaf fragments were prepared. Isolated fungi were grouped according to colony morphology and submitted to molecular identification.

Obtaining DNA sequences from mycelia

Genomic DNA was extracted from fresh cultures using a modified protocol of Doyle; Doyle (1987) and Lee; Taylor (1990). Fresh fungal mycelia were scraped from the surface of the agar plate and transferred into a 1,5 mL microcentrifuge tube with 600 µL of preheated (65°C) CTAB extraction buffer (2% w/v CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, pH 8.0). Fungal mycelia were ground using plastic pestle and then incubated in a heat block at 65°C for 60 min with occasional mixing. An equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) was added to each tube and mixed thoroughly in a vortex. The mixture was centrifuged at 12,000 g for 15 min at room temperature and 500 µL of the aqueous phase was transferred into a fresh 1.5 mL tube. After adding 300 µL of 100% isopropanol, microtubes were mixed by inversion and centrifuged at 12,000 g for 10 min. Supernatant was discarded, the DNA pellet washed twice with 70% ethanol and dried in a vacuum centrifuge for 10 min. The DNA pellet was then resuspended in 70 µL sterile water.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the ITS (internal transcribed spacer) region using universal primers ITS1-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS-4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and the following thermocycler conditions: 94 °C for 5 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 54 °C for 30 s, 72 °C for 1 min; and final extension at 72 °C for 5 min (WHITE *et al.*, 1990). The sizes of the amplified products were confirmed by 1 % agarose gel electrophoresis. PCR products were purified using Illustra™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and sequencing was performed with Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems), according to manufacturer's recommendation and ran in an ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

ITS sequences were aligned using Clustal-X software and manually edited using Bioedit (HALL, 1999). Nucleotide sequence BLAST searches were performed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database to identify the closest species for each fungal strain.

Preferences test of *Atta sexdens* for cultivars of olive trees

The experiment was conducted in Laboratório de Formigas Cortadeiras, UNESP, Rio Claro – SP. The four most planted cultivars in the state of São Paulo and Minas Gerais, were tested: Arbequina, Grappolo, Koroneiki and Picual. One gram of leaves of each cultivar was used per experiment, with six replications. In each experiment, a nest of *Atta sexdens* artificially created in the laboratory at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ was used. The standard plant material used to feed the ant colonies were leaves of *Ligustrum lucidum*. Each nest contained 1L of fungus garden and were left without a supply of standard plant material for 48 hours before the preference test. The feeding station was replaced by a foraging arena, which consisted of a 30 cm x 10 cm plastic tray, connected with four plastic pipes, each connected to a 10 cm diameter and 7 cm high plastic pot. In each plastic pot, the leaves of the different cultivars were placed, which were drawn before being placed in the ant nests. The experiment was concluded when one of the cultivars was completely harvested and transported from the foraging arena. The remaining leaves weight was submitted to ANOVA post-hoc Tukey test with a p-value = 0.005.

Results

Diversity of endophytic fungi

Approximately 800 fungal isolates were obtained and morphologically separated into 191 groups. One isolate of each group was submitted to ITS amplicon sequencing. The endophytic fungi were assigned to seven classes of which Sordariomycetes (59%) and Dothideomycetes (33%), were the most frequent. Thirty-eight genera were recovered among which *Diaporthe* (26%), *Colletrotrichum* (11%), *Xylaria* (9%), *Alternaria* (5%) and *Neofusicoccum* (5%) were the most frequent. These five genera accounted for 56% of the diversity of the whole fungal community. (Table 1).

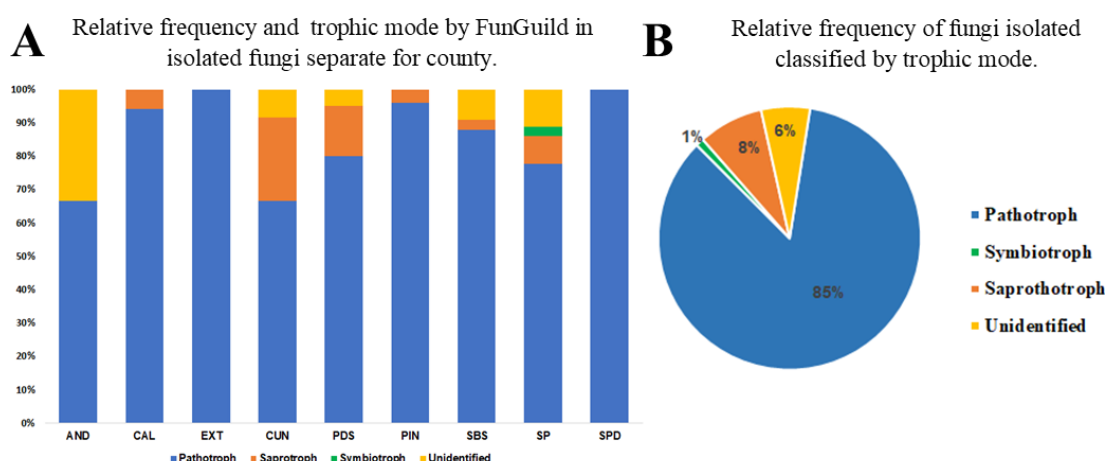
Table 1. Diversity of endophytic fungi genera isolated from leaves of olive trees cultivated in the state of São Paulo [Cunha (CUN), Pinhalzinho (PIN), São Pedro (SPD), Pilar do Sul (PDS), São Bento do Sapucaí (SBS) and São Paulo (SP)]; and in the state of Minas Gerais [Extrema (EXT), Andradas (AND) and Caldas (CAL)].

Genus	N. of isolated	AND	CAL	EXT	CUN	PDS	PIN	SBS	SP	SPD
<i>Alternaria</i>	10						X		X	
<i>Aspergillus</i>	2							X		
<i>Aureobasidium</i>	6							X	X	
<i>Bipolaris</i>	2						X	X		
<i>Botryosphaeria</i>	2							X		
<i>Cercospora</i>	2					X				
<i>Cladosporium</i>	6								X	X
<i>Colletotrichum</i>	21		X			X	X	X	X	
<i>Diaporthe</i>	49	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Didymella</i>	3								X	
<i>Epicoccum</i>	1						X			
<i>Fusarium</i>	1								X	
<i>Lectera</i>	1						X			
<i>Leptosphaerulina</i>	1								X	
<i>Muscodora</i>	1								X	
<i>Mycosphaerella</i>	3							X	X	
<i>Nemania</i>	2		X					X		
<i>Neocurbitaria</i>	1	X								
<i>Neofusicoccum</i>	10		X			X		X	X	
<i>Nigrograna</i>	1								X	
<i>Nigrospora</i>	3					X	X			
<i>Penicillium</i>	1							X		
<i>Pestalotia</i>	1						X			
<i>Pestalotiopsis</i>	1						X			
<i>Peziza</i>	1							X		
<i>Phlebia</i>	1							X		
<i>Phoma</i>	2								X	
<i>Phomopsis</i>	7		X	X				X	X	
<i>Phyllosticta</i>	6			X		X		X	X	
<i>Preussia</i>	1					X				
<i>Pseudocercospora</i>	4					X	X	X		
<i>Rhizopus</i>	1						X			
<i>Sarocladium</i>	3				X					
<i>Tremateia</i>	2					X				
<i>Trichoderma</i>	3						X			
<i>Trichophaea</i>	2							X		
<i>Xepicula</i>	3								X	
<i>Xylaria</i>	18	X	X		X		X	X		
Unidentified	6				X			X	X	
Total	191	3	6	3	4	9	13	18	17	1

Trophic mode of endophytic fungi

According to the FunGuild database, the endophytic fungi could be assigned to four trophic modes: pathotroph, saprotroph, symbiotroph and unidentified for isolated fungi. The most common trophic mode was pathotrophic (85%) followed by sapotrophic (8%), unidentified (6%) and symbiotroph with 1%, (Figure 1 B). In all counties, the pathotrophs were predominant with frequencies between 65 to 100% (Figure 1A).

Figure 1. Trophic mode of endophytic fungi from leaves of olive trees according to the FunGuild database. A - Relative frequencies of the trophic modes by counties. B - Overall relative frequencies of trophic modes.



Preference of leaf-cutting ants towards olive tree cultivars

Main cultivars planted in the study area were Arbequina, Grappolo, Koroneiki and Picual. The preference test of leaf-cutting ants did not show significant differences between cultivars (ANOVA variance test, $F = 3.44$, $p\text{-value} = 0.361$).

Discussion

Olive trees hosts a high diversity of endophytic fungi

We recovered thirty-eight genera of fungi in leaves of olives tree, among these the most frequent was *Diaporthe*, of which some species are known as pathogens of plants, including olive trees (MATERATSKI *et al.*, 2018). The second most frequent was *Colletotrichum*, an important genus of phytopathogens with many species reported as pathogenic for olive trees in numerous producing regions such as Portugal and Spain (MATERATSKI *et al.*, 2018; MORAL *et al.*, 2014). *Colletotrichum* species such as *C. gloeosporioides*, *C. aenigma*, *C. kahawae*, *C. siamense*, *C. acutatum*, *C. godeatiae*, *C. nymphaeae*, and *C. rhombiforme* can cause the anthracnose disease that attacks trees and mainly fruits, causing severe losses and impacting on the quality of the oil causing reddish color, high acidity and reduction of polyphenols (MORAL *et al.*, 2014, KOLAINIS *et al.*, 2020). These results were interesting because the leaves collected were apparently healthy suggesting that the pathogen could be quiescent and, given the proper conditions, it can proliferate and induce disease symptoms. Third most frequent genus was *Xylaria* that is a known decomposer of wood and frequently found in surveys for endophytes (DAVIS *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2016). *Xylaria* has already been found in olive tree in Brazil (SIA *et al.*, 2013).

The two most frequent genera in this study were also recovered at frequencies of 61% for *Diaporthe* and 12% for *Colletotrichum* in *Hevea* and *Micrandra* seedlings (SKALTSAS *et al.*, 2019). Interestingly, the three most frequent genera in our study, *Diaporthe*, *Colletotrichum* and *Xylaria* were also the most commonly found, 75% of all isolates, in several plant species along an altitudinal gradient in a study conducted in wet forests of Costa Rica (ROJAS-JIMENEZ *et al.*, 2016). In general, these fungi show rapid growth in a Potato Dextrose Agar (PDA) medium that is composed of a simple sugar source of Dextrose, maybe this may have favored the growth of these genera.

Sia *et al.*, (2013) isolated seven genera of fungi from leaves of olive trees in Brazil, two of them, *Daldinnia* sp. and *Guignardia* sp) were not found in our study but five genera, *Xylaria*, *Nigrospora*, *Diaporthe*, *Colletotrichum*, and *Aspergillus* were common to both studies. In the current study thirty-eight fungal genera were recovered, of which thirty-two are registered for the first time for olive trees in the Brazil. Nevertheless, our list of fungal genera is strikingly congruent with that presented by Nicoletti *et al.*, (2020), in their review article on endophytic fungi of olive trees, where most of the data come from studies conducted in European countries such as Portugal, Italy and Spain. That olive trees encountered and recruited a very similar set of fungal endophytes in such distinct and distant environments is noteworthy.

In recent years, studies about ecology of fungal communities using the FunGuild database has been employed in order to understand niches and behavior of these organisms (MARTINEZ-DIZ *et al.*, 2019; PANG *et al.*, 2019; SKALTSAS *et al.*, 2019).

Our results showed that the most abundant trophic mode was pathotrophic followed by saprotrophic, unidentified and symbiotrophic. Pathotrophic fungi, according to Nguyen *et al.*, (2016), receive nutrients from but harms host cells. Some of the recovered genera such as *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Pseudocercospora*, and *Phoma* harbor many phytopathogenic species.

In a study carried out in eight localities with native and non-native lineages of the plant species *Phragmites australis*, it has been hypothesized that beneficial associations with bacteria, fungi and oomycetes could promote non-native species to invade new sites (BICKFORD *et al.*, 2018). It was found that the place where the plants occur influences the diversity of the microorganism community more than the host, thus refuting their hypothesis, the prevalence of pathotrophs, followed by saprotrophs and symbiotrophs was observed for the root fungal community (BICKFORD *et al.*, 2018).

A research carried out in vineyards with the aim of understanding the relationships between soil-plant compartments (bulk soil, rhizosphere and endorizosphere) and fungal microbiome diversity showed that diversity was lower in the endorizosphere, suggesting that the root tissue may act as a physical barrier for fungi. Trophic modes also differed between bulk soil and rhizosphere compartments compared to the endorizosphere, with a higher frequency of sapotrophs and symbiotrophs in the latter (MARTÍNEZ-DIZ *et al.*, 2019). These results were different from what we have found in our study, where the majority of fungi were pathotrophic and saprotrophic, possibly because we dealt with leaf endophytes.

Olive tree cultivars are equally attractive to leaf-cutting

The genera *Atta* and *Acromyrmex* of leaf-cutting ants are native to the Neotropical region, with distribution from north of Argentina to south of the United States (ANTWEB, 2020), while the olive tree is native of the Mediterranean region (ALBEN; VILLAMEL, 2003). Therefore, this plant species did not coevolve with leaf-cutting ants, probably making it very susceptible to attacks by these herbivorous insects. The test with leaf-cutting ants to verify the cutting preference for some commercial olive cultivar showed that all tested cultivars are equally attractive. The ability of leaf-cutting ants to forage non-native plants is also observed for crops such as *Pinus* and *Eucalyptus* (AMANTE, 1967; MARICONI, 1970; ZANETTI *et al.*, 2014). Factors such as tenacity, leaf age and content of secondary metabolites can influence attractiveness for leaf-cutting ants, but abundance and diversity of endophytic fungi can also play a role (COBLENTZ; VAN BAEL, 2013, ESTRADA *et al.*, 2015; VAN BAEL *et al.*, 2009).

Our study in laboratory condition showed that cultivar is not a determining factor for the choice of cut by leaf-cutting ants, disagreeing with a report based on farmers observation in the field. Further field studies under natural conditions are needed to confirm the foraging preferences of these insects.

This survey showed the greatest diversity of fungi associated with olive trees ever identified in Brazil. It is a first step towards answering whether the endophytic fungal community can reduce foraging by leaf-cutting ants, either directly through production of repellent compounds or indirectly by inducing metabolic or physical changes in the leaves, as proposed by Bittleston *et al.*, (2011).

References

- ALBEN, ALFREDO; VILLAMEL, JOSE. Histtoria y Distribucion del Cultivo, Propiedades, Clasificación Y Principales consumidores Del Aceite de oliva. **Inia**, [S. l.], p. 25–28, 2003.
- AMANTE, E. Prejuízos causados pela formiga saúva em plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* no Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, [S. l.], v. 6, p. 335–363, 1967.
- Antweb**. 2020. Disponível em: <https://www.antweb.org>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. de S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba - SP: Calq, 2002. v. 1
- BERGELSON, Joy; MITTELSTRASS, Jana; HORTON, Matthew W. Characterizing both bacteria and fungi improves understanding of the Arabidopsis root microbiome. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 24, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37208-z. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00386/full>.
- BICKFORD, Wesley A.; GOLDBERG, Deborah E.; KOWALSKI, Kurt P.; ZAK, Donald R. Root endophytes and invasiveness: no difference between native and non-native Phragmites in the Great Lakes Region. **Ecosphere**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e02526, 2018. DOI: 10.1002/ecs2.2526. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ecs2.2526>.
- BITTLESTON, L. S.; BROCKMANN, F.; WCISLO, W.; VAN BAEL, S. A. Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. **Biology Letters**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 30–32, 2011. DOI: 10.1098/rsbl.2010.0456. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2010.0456>.
- BRITTO, Júlio Sérgio De et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants Atta and Acromyrmex. **Ijres**, [S. l.], v. 3, n. October 2017, p. 11–92, 2016.
- CARPER, Dana L.; CARRELL, Alyssa A.; KUEPPERS, Lara M.; FRANK, A. Carolin. Bacterial endophyte communities in *Pinus flexilis* are structured by host age, tissue type, and environmental factors. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 428, n. 1–2, p. 335–352, 2018. DOI: 10.1007/s11104-018-3682-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-018-3682-x>.
- CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! [S. l.], v. 322, p. 321–322, 1996.
- COBLENTZ, Kyle E.; VAN BAEL, Sunshine A. Field colonies of leaf-cutting ants select plant materials containing low abundances of endophytic fungi. **Ecosphere**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1890/ES13-00012.1. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1890/ES13-00012.1>.
- DAVIS, Thomas Seth; LANDOLT, Peter J. A Survey of Insect Assemblages Responding to Volatiles from a Ubiquitous Fungus in an Agricultural Landscape. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 860–868, 2013. DOI: 10.1007/s10886-013-0278-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-013-0278-z>.
- DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jan L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. [s.l: s.n.].
- ESTRADA, Catalina; DEGNER, Ethan C.; ROJAS, Enith I.; WCISLO, William T.; VAN BAEL, Sunshine A. The role of endophyte diversity in protecting plants from defoliation by leaf-cutting ants. **Current Science**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 55–61, 2015.
- HALL, Thomas A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S. l.], v. 41, p. 95–98, 1999. Disponível em: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/29520866/1999hall1.pdf?response-content-disposition=inline%3B+filename%3DBioEdit_a_user-friendly_biological_seque.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=ASIATUSBJ6BAMGV4PH6W%2F20200415%2Fus-east-1

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. **Bacterial endophytes in agricultural crops** *Canadian Journal of Microbiology* Canadian Science Publishing, , 1997. DOI: 10.1139/m97-131.

HARDOIM, Pablo R.; VAN OVERBEEK, Leonard S.; BERG, Gabriele; PIRTILÄ, Anna Maria; COMPANT, Stéphane; CAMPISANO, Andrea; DÖRING, Matthias; SESSITSCH, Angela. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015. DOI: 10.1128/MMBR.00050-14. Disponível em: <https://mmbr.asm.org/content/79/3/293>.

KOLAINIS, Stefanos; KOLETTI, Anastasia; LYKOGIANNI, Maira; KARAMANOU, Dimitra; GKIZI, Danai; TJAMOS, Sotirios E.; PARASKEUOPOULOS, Antonios; ALIFERIS, Konstantinos A. An integrated approach to improve plant protection against olive anthracnose caused by the *Colletotrichum acutatum* species complex. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1–22, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0233916. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0233916>.

LE COCQ, Kate; GURR, Sarah J.; HIRSCH, Penny R.; MAUCHLINE, Tim H. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 469–473, 2017. DOI: 10.1111/mpp.12483.

LEE, Steven B.; TAYLOR, John W. ISOLATION OF DNA FROM FUNGAL MYCELIA AND SINGLE SPORES. In: **PCR Protocols**. [s.l.] : Elsevier, 1990. p. 282–287. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X>.

LÖFSTEDT GILLJAM, John; LEONEL, Juliana; COUSINS, Ian T.; BENSKIN, Jonathan P. Is Ongoing Sulfluramid Use in South America a Significant Source of Perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production Inventories, Environmental Fate, and Local Occurrence. **Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 653–659, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.5b04544.

MARICONI, Francisco A. M. **As saúvas**. [s.l.] : Agronômica Ceres São Paulo, 1970.

MARTÍNEZ-DIZ, María del Pilar; ANDRÉS-SODUPE, Marcos; BUJANDA, Rebeca; DÍAZ-LOSADA, Emilia; EICHMEIER, Ales; GRAMAJE, D. Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 41, p. 234–244, 2019. DOI: 10.1016/j.funeco.2019.07.003.

MATERATSKI, Patrick; VARANDA, Carla; CARVALHO, Teresa; DIAS, António Bento; DOROTEIA CAMPOS, M.; REI, Fernando; DO ROSÁRIO FÉLIX, Maria. Diversity of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose and new perspectives on controlling the disease in Portugal. **Agronomy**, [S. l.], v. 8, n. 12, 2018. DOI: 10.3390/agronomy8120301.

MORAL, J.; XAVIÉR, C.; ROCA, L. F.; ROMERO, J.; MOREDA, W.; TRAPERO, A. La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. **Grasas y Aceites**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. e028, 2014. DOI: 10.3989/gya.110913. Disponível em: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1493/1562>.

NASCIMENTO, T. L.; OKI, Y.; LIMA, D. M. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G. Wilson; SOUZA-MOTTA, C. M. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 14, p. 79–86, 2015. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.10.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.004>.

NGUYEN, Nhu H.; SONG, Zewei; BATES, Scott T.; BRANCO, Sara; TEDERSOO, Leho; MENKE, Jon; SCHILLING, Jonathan S.; KENNEDY, Peter G. FUNguild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 20, p. 241–248, 2016. DOI: 10.1016/j.funeco.2015.06.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504815000847>.

NICOLETTI, Rosario; DI VAIO, Claudio; CIRILLO, Chiara. Endophytic Fungi of Olive Tree. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1321, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8091321. Disponível

em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1321>.

PANG, Ziqin; TAYYAB, Muhammad; KONG, Chuibao; HU, Chaohua; ZHU, Zhisheng; WEI, Xin; YUAN, Zhaonian. Liming Positively Modulates Microbial Community Composition and Function of Sugarcane Fields. **Agronomy**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 808, 2019. DOI: 10.3390/agronomy9120808. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/12/808>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, 2019. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.

ROJAS-JIMENEZ, Keilor; HERNANDEZ, Myriam; BLANCO, Jorge; VARGAS, Luis Diego; ACOSTA-VARGAS, Luis Guillermo; TAMAYO, Giselle. Richness of cultivable endophytic fungi along an altitudinal gradient in wet forests of Costa Rica. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 20, p. 124–131, 2016. DOI: 10.1016/j.funeco.2015.12.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.006>.

SIA, Eliandra de Freitas; MARCON, Joelma; LUVIZOTTO, Danice Mazzer; QUECINE, Maria Carolina; TSUI, Sarina; PEREIRA, José Odair; PIZZIRANI-KLEINER, Aline Aparecida; AZEVEDO, João Lúcio. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **SpringerPlus**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1186/2193-1801-2-579.

SILES, José A.; MARGESIN, Rosa. Seasonal soil microbial responses are limited to changes in functionality at two Alpine forest sites differing in altitude and vegetation. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 2204, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02363-2. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02363-2>.

SKALTSAS, Demetra N.; BADOTTI, Fernanda; VAZ, Aline Bruna Martins; SILVA, Felipe Ferreira Da; GAZIS, Romina; WURDACK, Kenneth; CASTLEBURY, Lisa; GÓES-NETO, Aristóteles; CHAVERRI, Priscila. Exploration of stem endophytic communities revealed developmental stage as one of the drivers of fungal endophytic community assemblages in two Amazonian hardwood genera. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 12685, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-48943-2. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-48943-2>.

TEDERSOO, Leho et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, [S. l.], v. 346, n. 6213, p. 1256688, 2014. DOI: 10.1126/science.1256688. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaa1185>.

THOMAS, Daniel C.; VANDEGRIFT, Roo; LUDDEN, Ashley; CARROLL, George C.; ROY, Bitty A. Spatial Ecology of the Fungal Genus *Xylaria* in a Tropical Cloud Forest. **Biotropica**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 381–393, 2016. DOI: 10.1111/btp.12273. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/btp.12273>.

VAN BAEL, Sunshine A.; VALENCIA, Mariana C.; ROJAS, Enith I.; GÓMEZ, Nélide; WINDSOR, Donald M.; HERRE, Edward A. Effects of foliar endophytic fungi on the preference and performance of the leaf beetle *Chelymorpha alternans* in Panama. **Biotropica**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 221–225, 2009. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2008.00476.x.

VAN OVERBEEK, Leonard S.; SAIKKONEN, Kari. Impact of Bacterial-Fungal Interactions on the Colonization of the Endosphere. **Trends in Plant Science**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 230–242, 2016. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.003>.

WEMHEUER, Franziska; WEMHEUER, Bernd; DANIEL, Rolf; VIDAL, Stefan. Deciphering bacterial and fungal endophyte communities in leaves of two maple trees with green islands. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 14183, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-50540-2. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-50540-2>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: **PCR Protocols**. [s.l.] :

Elsevier, 1990. v. 2p. 315–322. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.

YAO, Hui; SUN, Xiang; HE, Chao; MAITRA, Pulak; LI, Xing Chun; GUO, Liang Dong. Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. **Microbiome**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1186/s40168-019-0671-0.

ZANETTI, Ronald; ZANUNCIO, José; SANTOS, Juliana; DA SILVA, Willian; RIBEIRO, Genésio; LEMES, Pedro. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. **Forests**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014. DOI: 10.3390/f5030439. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4907/5/3/439>.

5. CONSIDERAÇÕES

- A diversidade de bactérias endofíticas não-cultiváveis associadas às folhas de oliveiras cultivadas na Região Sudeste foi influenciada pela geografia do local em que foi coletada e que outros fatores como altitude, idade e cultivar não apresentaram diferença significativa para a alfa e beta diversidade quando se diz respeito a composição e abundância desses microrganismos.
- Análises da diversidade de fungos endofíticos não-cultiváveis associados às folhas de oliveiras, apresentaram influencia em fatores como altitude, idade e geografia foram importantes e significativos para a composição e abundância dessa comunidade, entretanto, cultivar não demonstrou influência nessa diversidade.
- Em relação ao modo trófico para a comunidade de fungos não cultiváveis foi obtido que o grupo mais abundante foi não identificado seguido de patotrófico o que podemos inferir que muitos desses organismos ainda não são conhecidos. Isso sugere que são necessárias maiores informações a respeito desses fungos. Diferentemente dos fungos cultiváveis onde a maioria foi classificada como patotróficos seguidos de sapotróficos, correspondendo com os gêneros mais abundantes como potenciais agentes patogênicos.
- Ao analisar as correlações entre fungos e bactérias não-cultiváveis foram obtidas um maior número de correlações positivas comparadas com números de correlações negativas entres as comunidades avaliadas.
- No total foram identificados 38 gêneros de fungos cultiváveis, onde 32 deles são inéditos para oliveiras no Brasil. Os gêneros mais abundantes em número de isolados foram *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Xylaria*, *Alternaria* e *Neofusicoccum*.
- Não houve diferença significativa sobre a preferência de corte por formigas-cortadeiras entre as cultivares testadas de oliveiras (*Olea europaea* L.).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELSON FRANCISCO DE OLIVEIRA. **Oliveira no Brasil Tecnologias de produção**. 1. ed. [s.l.] : EPAMIG, 2012.

Antweb. 2020. Disponível em: <https://www.antweb.org>. Acesso em: 25 jul. 2020.

ARAÚJO, Welington L.; MARCON, Joelma; MACCHERONI, Walter; VAN ELSAS, Jan Dirk; VAN VUURDE, Jim W. L.; AZEVEDO, João Lúcio. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/68/10/4906>.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**, [S. l.], v. 1, p. 189–207, 2007.

AZEVEDO, João Lúcio; WALTER MACCHERONI JR.; PEREIRA, Jose Odair; ARAÚJO, Welington De. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02827580510008248>.

BALLUS, Cristiano Augusto; MEINHART, Adriana Dillenburg; DE SOUZA CAMPOS, Francisco Alberto; DA SILVA, Luiz Fernando de Oliveira; DE OLIVEIRA, Adelson Francisco; GODOY, Helena Teixeira. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. **Food Research International**, [S. l.], v. 62, p. 74–83, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.02.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.040>.

BERGELSON, Joy; MITTELSTRASS, Jana; HORTON, Matthew W. Characterizing both bacteria and fungi improves understanding of the Arabidopsis root microbiome. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 24, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37208-z. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00386/full>.

BERTONCINI, E. I.; TERAMOTO, J. R. S.; PRELA-PANTANO, A. **Desafios para Produção de Azeite no Brasil Infobibos - Informações Tecnológicas**, 2010. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/DesafioOliva/index.htm.

BERTONCINI, Edna Ivani. **Situação da olivicultura no Brasil Desafios para a cultura no estado de São Paulo Ações do Grupo Oliva SP**. 2018. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/07153718-2-situacao-em-sp-edna-bertoncini-nov2018.pdf>. Acesso em: 12 set. 2020.

BESNARD, Guillaume; BERVILLÉ, André. Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, [S. l.], v. 323, n. 2, p. 173–181, 2000. DOI: 10.1016/S0764-4469(00)00118-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0764446900001189>.

BITTLESTON, L. S.; BROCKMANN, F.; WCISLO, W.; VAN BAEL, S. A. Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. **Biology Letters**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 30–32, 2011. DOI: 10.1098/rsbl.2010.0456. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2010.0456>.

BOLYEN, Evan et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.

Bokulich, N.A.; Kaehler, B.D.; Rideout, J.R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G.A.; Gregory Caporaso, J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **2018**, *6*, 90.

BRITTO, Júlio Sérgio De et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Ijres*, [S. l.], v. 3, n. October 2017, p. 11–92, 2016.

CALLAHAN, Benjamin J.; MCMURDIE, Paul J.; ROSEN, Michael J.; HAN, Andrew W.; JOHNSON, Amy Jo A.; HOLMES, Susan P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016. DOI: 10.1038/nmeth.3869. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nmeth.3869>.

CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. DOI: 10.1038/ismej.2012.8. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ismej20128>.

Clarke, K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecol.* **1993**, *18*, 117–143.

CHERRETT, J. M. The biology, pest status and control of leaf-cutting ants. **The biology, pest status and control of leaf-cutting ants.**, [S. l.], p. 1–37, 1986.

CIVANTOS, L. **La olivicultura en el mundo y en España El cultivo del olivo**. [s.l.] : Madrid: Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-Prensa, 2008.

CLAY, Keith. **Fungal Endophytes of Grasses**Source: **Annual Review of Ecology and Systematics**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2097026>.

COBLENTZ, Kyle E.; VAN BAEL, Sunshine A. Field colonies of leaf-cutting ants select plant materials containing low abundances of endophytic fungi. *Ecosphere*, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1890/ES13-00012.1. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1890/ES13-00012.1>.

COLETTA-FILHO, Helvécio Della; FRANCISCO, Carolina Sardinha; ROBERTO, João; LOPES, Spotti; DE OLIVEIRA, Adelson Francisco. First report of olive leaf scorch in Brazil , associated with *Xylella fastidiosa* subsp . pauca. **Phytopathologia Mediterranea**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 130–135, 2016. DOI: 10.14601 /Phytopathol_Mediterr-17259.

COSTA, Samara Maria Lopes; MELLONI, Rogério. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 169, 2019. DOI: 10.5902/1980509829936. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/29936>.

COUTINHO, Enilton Fick; CARLOTTO, Fabrício; THAÍS, Ribeiro; CAPPELLARO, Helena. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. v. 16 Disponível em: www.cpact.embrapa.br.

Davis, N.M.; Proctor, D.; Holmes, S.P.; Relman, D.A.; Callahan, B.J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **2018**, *6*, 226.

DISSANAYAKE, Asha J. et al. Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 85–107, 2018. DOI: 10.1007/s13225-018-0399-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0399-3>.

ELOI PAULUS. **CRESCIMENTO INICIAL DE OLIVEIRA “ARBEQUINA” EM DIFERENTES MANEJOS DO SOLO E DOSAGENS DE FÓSFORO**, 2011.

ESTRADA, Catalina; DEGNER, Ethan C.; ROJAS, Enith I.; WCISLO, William T.; VAN BAEL, Sunshine A. The role of endophyte diversity in protecting plants from defoliation by leaf-cutting ants.

http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2018/07/OLIVEIRAS_2018_DUPLA.pdf.

KOZDRÓJ, J.; TREVORS, J. T.; VAN ELSAS, J. D. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 1775–1784, 2004. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.04.034.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 55–59, 2004. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01543.x.

LACAVA, Paulo Teixeira; LI, Wenbin; LUIZ, Wellington; JO, Araújo; LÚCIO AZEVEDO, João; HARTUNG, John Stephen. **The Endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* Reduces Symptoms Caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus***The Microbiological Society of Korea. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.fundecitrus.com.br.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W256–W259, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz239. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/W1/W256/5424068>.

ŁUKASIK, P.; NEWTON, J.A.; SANDERS, J.G.; HU, Y.; MOREAU, C.S.; KRONAUER, D.J.C.; O'DONNELL, S.; KOGA, R.; RUSSELL, J.A. The structured diversity of specialized gut symbionts of the New World army ants. **Mol. Ecol.** **2017**, 26, 3808–3825.

MANDAL S, VAN TREUREN W, WHITE RA, EGGESBØ M, KNIGHT R, PEDDADA SD. 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial Ecology in Health and Disease** 26:27663 DOI 10.3402/mehd.v26.27663.

MARTÍNEZ-DÍZ, María del Pilar; ANDRÉS-SODUPE, Marcos; BUJANDA, Rebeca; DÍAZ-LOSADA, Emilia; EICHMEIER, Ales; GRAMAJE, D. Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 41, p. 234–244, 2019. DOI: 10.1016/j.funeco.2019.07.003.

MARTINS, Fátima; PEREIRA, Alberto; BENTO, Albino; BAPTISTA, Paula. **Diversidade e distribuição de fungos endofíticos em *Olea europaea* L.** VII Congresso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas. Madrid, 2014.

MCADAM, Paul R.; RICHARDSON, Emily J.; FITZGERALD, Ross R. High-throughput sequencing for the study of bacterial pathogen biology. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 106–113, 2014. DOI: 10.1016/j.mib.2014.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.002>.

McDonald, D.; Clemente, J.C.; Kuczynski, J.; Rideout, J.R.; Stombaugh, J.; Wendel, D.; Wilke, A.; Huse, S.; Hufnagle, J.; Meyer, F.; et al. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. **Gigascience** **2012**, 1, 7.

McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS One** **2013**, 8, e61217.

MEJÍA, Luis C. et al. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. SEP, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00479.

MIRAGAIA, Marília. **Azeites brasileiros levam oito medalhas de ouro em competição em Nova York**. 2019. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/comida/2019/05/azeites-brasileiros-levam-oito-medalhas-de-ouro-em-competicao-em-nova-york.shtml>. Acesso em: 28 jul. 2020.

MIRARAB, Siavash; NGUYEN, Nam; WARNOW, Tandy. SEPP: SATé-enabled phylogenetic placement. In: **Biocomputing 2012**. 2012. p. 247–258.

NGUYEN, Nhu H.; SONG, Zewei; BATES, Scott T.; BRANCO, Sara; TEDERSOO, Leho; MENKE, Jon; SCHILLING, Jonathan S.; KENNEDY, Peter G. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. **Fungal Ecology**, [S. l.], v. 20, p. 241–248, 2016. DOI: 10.1016/j.funeco.2015.06.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504815000847>.

NILSSON, R. Henrik; ANSLAN, Sten; BAHRAM, Mohammad; WURZBACHER, Christian; BALDRIAN, Petr; TEDERSOO, Leho. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 95–109, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0116-y. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>.

OWNLEY, Bonnie H.; GWINN, Kimberly D.; VEGA, Fernando E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 113–128, 2010. DOI: 10.1007/s10526-009-9241-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10526-009-9241-x>.

PATANITA, M. I.; REIS, J. Monitoring of the main pests of olive in Alentejo (Portugal). In: INTERNATIONAL CONGRESSO OF CROP PROTECTION 2007, **Anais [...]**. : International Organisation for Biological Control Bragança, 2007.

PETTIT, Robin K. **Mixed fermentation for natural product drug discovery** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-1916-9.

PRADO, E. C.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; ALVARENGA, T. M. Pragas da oliveira: bioecologia, inimigos naturais e manejo. In: **Oliveira no Brasil tecnologias de produção**. EPAMIG. [s.l.: s.n.]. p. 498–515.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, 2019. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.

RASCHE, Frank; TRONDL, Robert; NAGLREITER, Christina; REICHENAUER, Thomas G.; SESSITSCH, Angela. Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 1036–1045, 2006. DOI: 10.1139/W06-059.

ROCHA, Silma L.; EVANS, Harry C.; JORGE, Vanessa L.; CARDOSO, Lucimar A. O.; PEREIRA, Fernanda S. T.; ROCHA, Fabiano B.; BARRETO, Robert W.; HART, Adam G.; ELLIOT, Simon L. Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. **Royal Society Open Science**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 160628, 2017. DOI: 10.1098/rsos.160628. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.160628>.

ROSA, Juliana Magrinelli Osório; OLIVEIRA, Claudio Marcelo Gonçalves De. **Medidas de manejo contra nematoides em oliveira**. 2020. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/noticias/medidas-de-manejo-contr-nematoides-em-oliveira>. Acesso em: 12 set. 2020.

SÁ PEIXOTO, Neto; ACCIOLY, Pedro; DE AZEVEDO, Lúcio, João; CAETANO, Luiz Carlos. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 69–72, 2004. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85630404>.

SHANNON, Paul; MARKIEL, Andrew; OZIER, Owen; BALIGA, Nitin S.; T.WANG, Jonathan; RAMAGE, Daniel; AMIN, Nada; SCHWIKOWSKI, Benno; IDEKER, Trey. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. DOI: 10.1101/gr.1239303. Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110001910481/>.

THOMPSON, Luke R. et al. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. **Nature**, [S. l.], v. 551, n. 7681, p. 457–463, 2017. DOI: 10.1038/nature24621.

- TRIFINOPOULOS, Jana; NGUYEN, Lam-Tung; VON HAESELER, Arndt; MINH, Bui Quang. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw256. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw256>.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res.** **2013**, *41*, D590–D596.
- VAN BAELE, Sunshine A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, Hermógenes; VALENCIA, Mariana C.; ROJAS, Enith I.; WCISLO, William T.; HERRE, Edward A. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 276, n. 1666, p. 2419–2426, 2009. DOI: 10.1098/rspb.2009.0196. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2009.0196>.
- VAN BAELE, SUNSHINE A.; SEID, MARC A.; WCISLO, WILLIAM T. Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecological Entomology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 318–321, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2311.2012.01364.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2311.2012.01364.x>.
- VELOSO, Tomás Gomes Reis; DA SILVA, Marliane de Cássia Soares; CARDOSO, Wilton Soares; GUARÇONI, Rogério Carvalho; KASUYA, Maria Catarina Megumi; PEREIRA, Lucas Louzada. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-71309-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71309-y>.
- VIEIRA NETO, J.; OLIVEIRA, A. F. De; OLIVEIRA, N. C. De; DUARTE, H. da S. .. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira** (E. D. Gonçalves, Org.) **Belo Horizonte: EPAMIG** Belo Horizonte (MG) EPAMIG, , 2008.
- VILLA, F. Origem e expansão da oliveira na América Latina. **OLIVEIRA, AF de. et al. Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Belo Horizonte: Epamig**, [S. l.], 2012.
- WHIPPS, J. M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G. D. **Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype** **Journal of Applied Microbiology**, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: **PCR Protocols**. [s.l.] : Elsevier, 1990. v. 2p. 315–322. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- WILSON, D. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, v. 73, n. 2, p. 274–276, 1995. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3545919>
- WILSON, D.; CARROLL, G. C. Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia*, v. 86, n. 5, p. 635–647, 1994.
- WILSON, D.; FAETH, S. H. Do fungal endophytes result in selection for leafminer ovipositional preference? *Ecology*, v. 82, n. 4, p. 1097–1111, 2001.
- WREGE, MARCOS SILVEIRA; COUTINHO, ENILTON FICK; PANTANO, ANGÉLICA PRELA; JORGE, ROGÉRIO OLIVEIRA. DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL DE OLIVEIRAS NO BRASIL E NO MUNDO. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 656–666, 2015. DOI: 10.1590/0100-2945-174/14. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452015000300656&lng=pt&tlng=pt.
- YILMAZ, P.; PARFREY, L.W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; PRUESSE, E.; QUAST, C.; SCHWEER,

T.; PEPLIES, J.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, D643–D648.

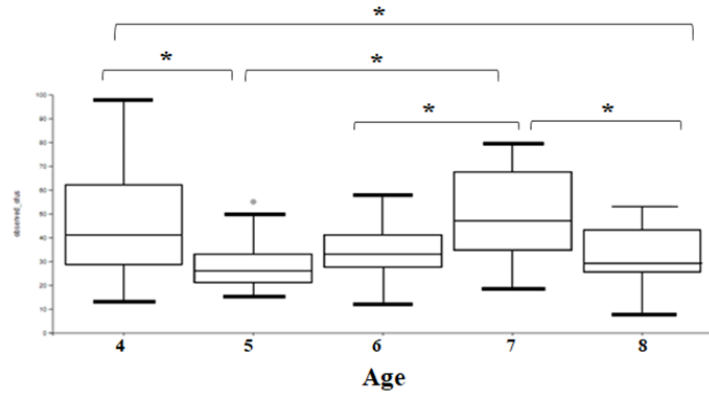
ZANETTI, Ronald; ZANUNCIO, José; SANTOS, Juliana; DA SILVA, Willian; RIBEIRO, Genésio; LEMES, Pedro. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. *Forests*, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014. DOI: 10.3390/f5030439. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4907/5/3/439>.

Material suplementar – Artigo 1 (Supplementar Material – Article 1)

Suppl.1 – Alpha diversity Index for factors influencing in fungal community. A- Observed_OTU for age plants. B- Observed_OTU for altitude, C- Observed_OTU for geography location.

A

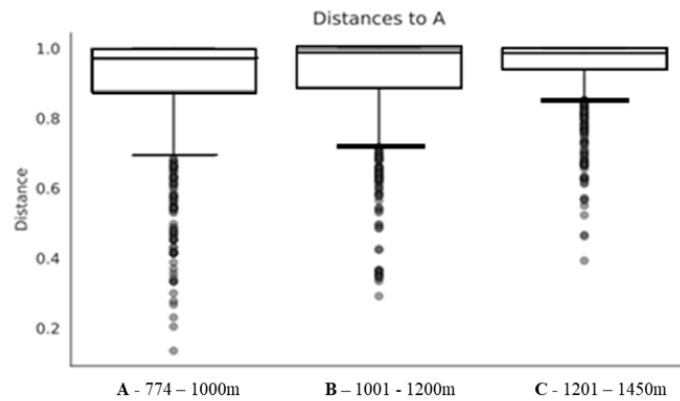
Observed OTU separate for age in fungal community in leaves of olive tree



Age	Pseudo - F	p-value
All groups	14.813	0.005
Pairwise		
Four vs. Five	6.210	0.012*
Five vs. Seven	10.950	0.009*
Six vs. Seven	5.026	0.024*
Seven vs. Eight	4.615	0.031*

B

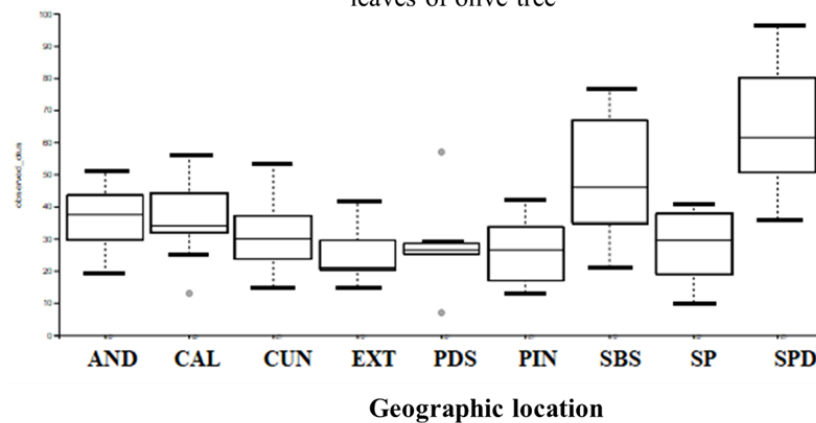
Observed OTU separate for altitude in fungal community in leaves of olive tree



Altitude scale	Pseudo-F	p-value
All groups	2.503	0.001
A - 774 - 1000m vs B - 1001 - 1200m	2.12	0.008*
A - 774 - 1000m vs C - 1201 - 1450m	2.92	0.001**
B - 1001 - 1200m vs C - 1201 - 1450m	2.54	0.001**

C

Observed OTU separate for geography in fungal community in leaves of olive tree



Geographic location	Pseudo-F	p-value
(all groups)	39.691	0,001
Pairwise		
AND vs. EXT	3.815	0,05*
AND vs. SPD	7.384	0,006**
CAL vs. EXT	5.438	0,019*
CAL vs. SPD	9.362	0,002**
CUN vs. SBS	5.270	0,021*
CUN vs. SPD	13.481	0,001**
EXT vs. SBS	12.689	0,001**
EXT vs. SPD	18.301	0,001**
PIN vs. SBS	10.081	0,001**
PIN vs. SPD	16.149	0,001**
PDS vs. SBS	4.766	0,029*
PDS vs. SPD	8.991	0,002**
SBS vs. SP	4.941	0,026*
SP vs. SPD	10.150	0,001**

Suppl.2 – Informações sobre ASVs, código Genbank, source_isolated, host and county envolvidas na análise de rede resultados separados por correlação negativa e positiva.

Correlations Negative - Bacteria and fungi ASVs					
Taxa_Bacteria	ASV_ID	Genbank_Cod	Source_isolated	Host	County
Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia_[ASV3]	51494dd8db5a016063b58fe8f8b816b8	MT626032.1	--	rice	--
Candidatus Gastranaerophilales bacterium_[ASV15]	84a83ce50cf250b14f41c4ae2acde048	LT007486.1	fermenter	--	--
Planctomycetia bacterium WSF3-27_[ASV42]	139869aada9968582eb3e9226202d4b3	MH528313.1	soil	forest	New Zealand
Bacteria_8_[ASV48]	e24e8e43bfc1ec20504fe10efa8431e3	CP033198.1	feces	fish	China
Edaphobacter_[ASV54]	36c9c6a21904607358693dc96b68ba85	KF424996.1	soil	grassland	South Korean
Enterococcaceae_[ASV60]	b0d41c95682a0ee83fd0032315dc5066	MT597704.1	--	--	--
Chthoniobacteraceae_[ASV71]	ba1df818c7d693243dac76b1312ac943	KY877536.1	rainwater	--	--
Conexibacter_[ASV75]	64f02dc127467b5ea38c558a13e45051	MK724180.1	soil	--	USA
Elsterales_[ASV76]	542c35b9d97e357e251f66d57d3ed86c	KU959883.1	soil	forest	China
Microbacteriaceae_[ASV78]	6956690ce06a36b239229f37504c8306	MT354032.1	--	--	--
Gemmata_[ASV85]	11a63f902f556c89bb1e4713b919b51e	KY690020.1	rhizosphere	--	--
Paraclostridium_[ASV92]	c2bd049e6bd93766a3539df62b6fc107	MT604800.1	--	--	--
Bacteria_15_[ASV100]	e669b0af7380e011846046e7931cb54a	KR854212.1	soil	tobacco crop	China
Methylobacterium_[ASV108]	b062eb1abbe05cefa0a38b98c3e25475	LC546537.1	leaf	<i>Acer palmatum</i>	Japan
Betaproteobacteriales_2_[ASV125]	1f8aad6616d84750ea04cf16c9854b61	LC290653.1	soil	--	Japan
Lachnospiraceae_5_[ASV134]	0a271374fc01ee5c1099524f401bb0be	KU476183.1	Hot spring	--	China
Negative correlations					
Taxa_Fungi	ASV_ID	Genbank_Cod	Source_isolated	Host	County
Symmetrospora_10_[ASV195]	2eaf4b0092f683621ccce590864d035e	KJ701231.1	leaf	<i>Quercus virginiana</i>	USA
Venturiales_3_[ASV322]	2434fc5aa7a3f4f200f7780d4fb7b995	MT379576.1	--	--	--
Mycosphaerellaceae_7_[ASV361]	8fee7be4be051596d64b38e16922803e	KP896022.1	fruit	<i>Citrus grandis</i>	China
Symmetrospora vermiculata_8_[ASV417]	e76edd207d8710aff8214cb72e88f315	KJ701213.1	rotting wood	--	USA
Vishniacozyma_victoriae_4_[ASV628]	9a0a5720bc2c1decc21c8868b311e98c	MK794203.1	--	--	--

Positive correlation - Bacteria and fungi ASVs						
Taxa_Bacteria	ASV_ID	Genbank_Cod	Sorce_isolated	Host	County	
Bacteroides [ASV2]	35a4d7d07ee4566702820cc307a60f4b	KU479887.1	Hot spring	--	China	
Bacteroides_2 [ASV5]	652e70e719eb180482e3ad952b5c3229	KX593646.1	feces	Pig	China	
Lactobacillus [ASV7]	78350e92a8b41cb13756271bb5fb6a32	MN055939.1	Intestine	<i>Gallus gallus</i>	Germany	
Bacteroidales [ASV8]	af6a4a621658e4e3ec3a781b79aebdca	GU957847.1	feces	rat	India	
Bacteroidales_2 [ASV14]	a6a25fa13479be485d01152a32398436	MF047143.1	gut	rat	China	
Megamonas [ASV18]	34c4697c49f9a346d18cd134cef0178	MN212499.1	feces	rat	Ireland	
Bacteroides_3 [ASV19]	8419f716310089e4e647242aafca58b9	KU471184.1	Hot spring	--	China	
Fournierella [ASV22]	2434b103a77fd69904dca6f096d0428e	HQ752037.1	gut	<i>Homo sapiens</i>	USA	
Akkermansia [ASV26]	6198a1b29ca6a053fa19423582f8e163	EU470223.1	feces	<i>Ovis vignei</i>	USA	
Lactobacillus_2 [ASV30]	a4d43540704a030a12a08689b6c6bc00	MT645512.1	--	--	China	
uncultured Ruminococcaceae bacterium [ASV31]	66d9efab514145ca830101cc948b976a	KP808136.1	gut	rat	China	
Bacillaceae [ASV33]	8bdd791b9f9c1c4fdabb30b38e59e64d	MT052643.1	water	farm	Brazil	
Synergistes [ASV35]	5e8002047c3d6253bfbdd3b16dec3a	MT546835.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	China	
Bacteroidales_3 [ASV38]	c30c408910569798b8cb227df18c404	HM105067.1	rumen	cow	USA	
Bacteroidales_4 [ASV40]	1bf9e936dd4999ab674eed5a2c2061fe	NR_121773.2	--	--	USA	
Bacteria_6 [ASV44]	7fa7ad7ba94589261f3e7224f54c4e90	KC802527.1	gut	squirrel	Taiwan	
Bacteroidales_5 [ASV46]	49099b7cbbdff96c24cd6258368c05db	FP081300.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	France	
Ruminococcaceae UCG-014 [ASV50]	bf132379ee7161e4f0e1934309e397f2	MT546775.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	China	
Prevotellaceae [ASV51]	ffd0fa63c87f7a96393256ba7a52cd6e	FJ757029.1	phyllosphere	<i>Quercus macrocarpa</i>	USA	
Bacteria_10 [ASV55]	919f2d351620ed71fc8aa8c3d1b6ba95	KJ701231.1	leaf	<i>Quercus virginiana</i>	USA	
Phascolarctobacterium [ASV64]	e38592cbb41667f3330ca69234719776	AB739694.1	--	--	Japan	
Lachnospiraceae_3 [ASV66]	b447d123d2d45f36acfe698c8f0a2ac5	MT546178.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	China	
Weissella [ASV67]	4b583ff30e9ff2a3ed5599ae812d1c57	MT516207.1	--	--	China	
Lactobacillus_3 [ASV69]	a37898c872207a9ebfa2133a1adeb98	MT613630.1	--	--	China	
Ruminococcaceae_2 [ASV72]	98fe3ca48fc8cbea9c868e340a4ea535	MT546987.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	China	
Faecalibacterium [ASV84]	51f374f6d7855815386c2fef32e7a08	MH569874.1	cecum	<i>Gallus gallus</i>	Belgium	
Bacteroides_5 [ASV86]	5aaf7294b07132ad9ae94b7f54a515ba	KU477678.1	Hot spring	--	China	
Lactobacillus_4 [ASV93]	280956314cfa35370f64731b6d6cfea	MT645504.1	--	--	China	
Bacteroides plebeius DSM.17135_2 [ASV95]	bbd18b5afeae2748c254f83c5c4466ea	MN215011.1	leaf	Spinach	Australia	
Alistipes_2 [ASV98]	30559a2796a883681081f58ee9f3bcb5	GU103878.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	Spain	
Prevotellaceae_2 [ASV102]	d47da625d22540fb7a2f5c12a6b1dd46	DQ456143.1	cecum	Turkey	USA	
Helicobacter [ASV111]	ce94b653e7af8ead9f73ab09cb494933	KY814473.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	Chile	
Ruminococcaceae_5 [ASV113]	f1b739311a050d750f49ff9263aff7f0	MH572031.1	cecum	<i>Gallus gallus</i>	Belgium	
Alistipes_3 [ASV114]	0b58fefa392e51f6e1012240f436aca	AP019736.1	feces	<i>Homo sapiens</i>	Japan	
Lactobacillus_6 [ASV115]	4e1ac21b17edcfd850522bb4ba934560	LC483558.1	--	--	Japan	
Bacteroidales_7 [ASV116]	cedcdeb2835b97c9229f22a677d08819	EU009860.1	cecum	Turkey	USA	
Prevotella_1 [ASV117]	e30d9f57e3d5b9c7ba3774b181a9768d	KU472690.1	Hot spring	--	China	
Listeria [ASV126]	549ef84d35d811faf6370ccb8c8f865d	MT631107.1	meat	--	Turkey	
Cutibacterium [ASV129]	c99244ad4036e0075990d7782da9498b	MT613579.1	--	--	China	
Bacteroides_6 [ASV131]	3096fd4eae2d8533c3a22b754a8bf1be	KR936056.1	Skin	<i>Homo sapiens</i>	Egypt	
Positive correlations						
Taxa_Fungi	ASV_ID	Genbank_Cod	Host	Sorce_isolated	County	
Fungi_26 [ASV94]	f9d3e2cdd5be25c7ad74ad3ca1ec70d3	GQ999160.1	air	air filter	Germany	
Fungi_36 [ASV127]	c1d60e5d0d5250644707c7b77d54012e	GQ999160.1	air	air filter	Germany	
Symmetrospora_10 [ASV195]	2eaf4b0092f683621ccce590864d035e	KJ701231.1	leaf	<i>Quercus virginiana</i>	USA	
Venturiales_3 [ASV322]	2434fc5aa7a3f4f200f7780d4fb7b995	MT379576.1	--	--	--	
Mycosphaerellaceae_7 [ASV361]	8fee7be4be051596d64b38e16922803e	KP896022.1	fruit	<i>Citrus grandis</i>	China	
Capnodiales_15 [ASV412]	b5ec8eeefedff086eb16007bcb5531ac	MG244316.1	leaf	oil palm tree	Brazil	
Symmetrospora vermiculata_8 [ASV417]	e76edd207d8710aff8214cb72e88f315	KJ701213.1	rotting wood	--	USA	
Genolevuria_14 [ASV466]	14e01eaffcf645d14fcc381b36d582	KY103460.1	air	--	Portugal	
Symmetrospora_21 [ASV534]	5bdb9274e6e2fe3baef1e2b1666beca6	KJ701231.1	leaf	<i>Quercus virginiana</i>	USA	
Carcinomyces arundinariae_8 [ASV549]	9134a8e8a684f5a71c89501ec843db5e	MG244467.1	leaf	oil palm tree	Brazil	
Symmetrospora_23 [ASV554]	bf8622bedf11eafea316dbcc084d245	MH625178.1	soil	--	New Zealand	
Strelitziana africana_7 [ASV561]	26ad81ad5f40306ae7f0eeb24d47c1d6	DQ885895.1	--	--	South Africa	
Symmetrospora_24 [ASV563]	6bdc90ed06cdc942ab9e9b317bf40f6d	LS996643.1	leaf	plant	China	
Dioszegia zsoltii var. yunnanensis_2 [ASV570]	2637200b5af7427ffe30d39b6d0760700	MT924428.1	soil	potato crop	China	
Vishniacozyma victoriae_4 [ASV628]	9a0a5720bc2c1decc21c8868b311e98c	MK794203.1	--	--	--	
Capnodiales_22 [ASV637]	c9576e17897552e091a7781a526d177	JN906801.1	phyllosphere	<i>Fagus sylvatica</i>	France	

Figure 2 Suppl.3 -Árvore filogenética com ASVs de bactérias obtidas nesse estudo (coloridas) e sequencias do Genbank (preta) resultantes da correlação negativa.

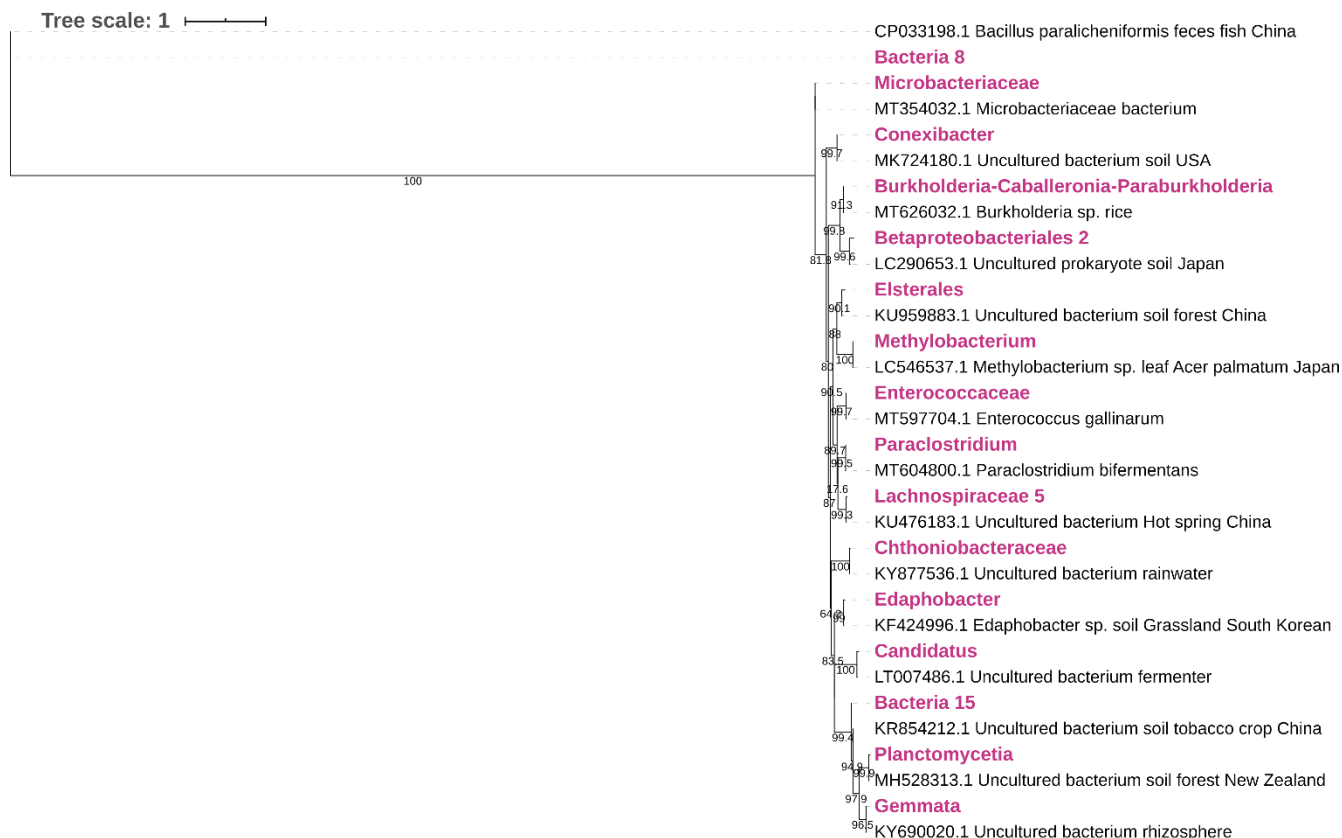


Figure 3 Suppl. 4- Árvore filogenética com ASVs de fungos obtidas nesse estudo (coloridas) e sequencias do Genbank (preta) resultantes da correlação negativa.

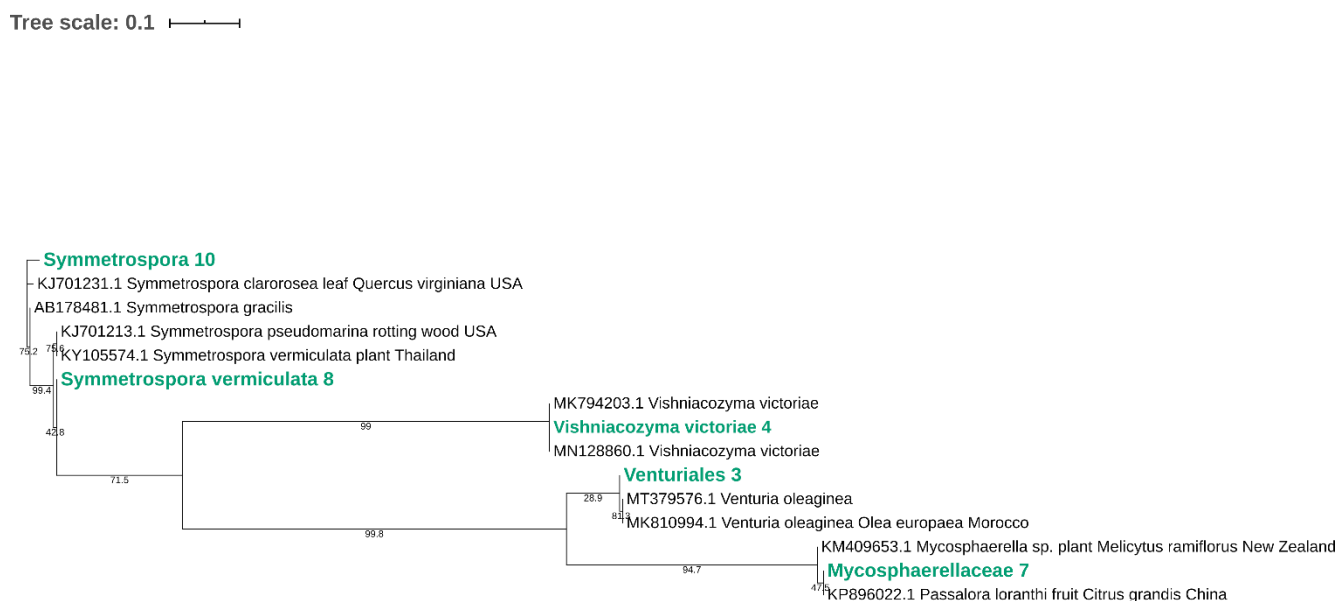


Figure 4 Suppl.5- Árvore filogenética com ASVs de bactérias obtidas nesse estudo (coloridas) e sequencias do Genbank (preta) resultantes da correlação positiva.

Tree scale: 1 

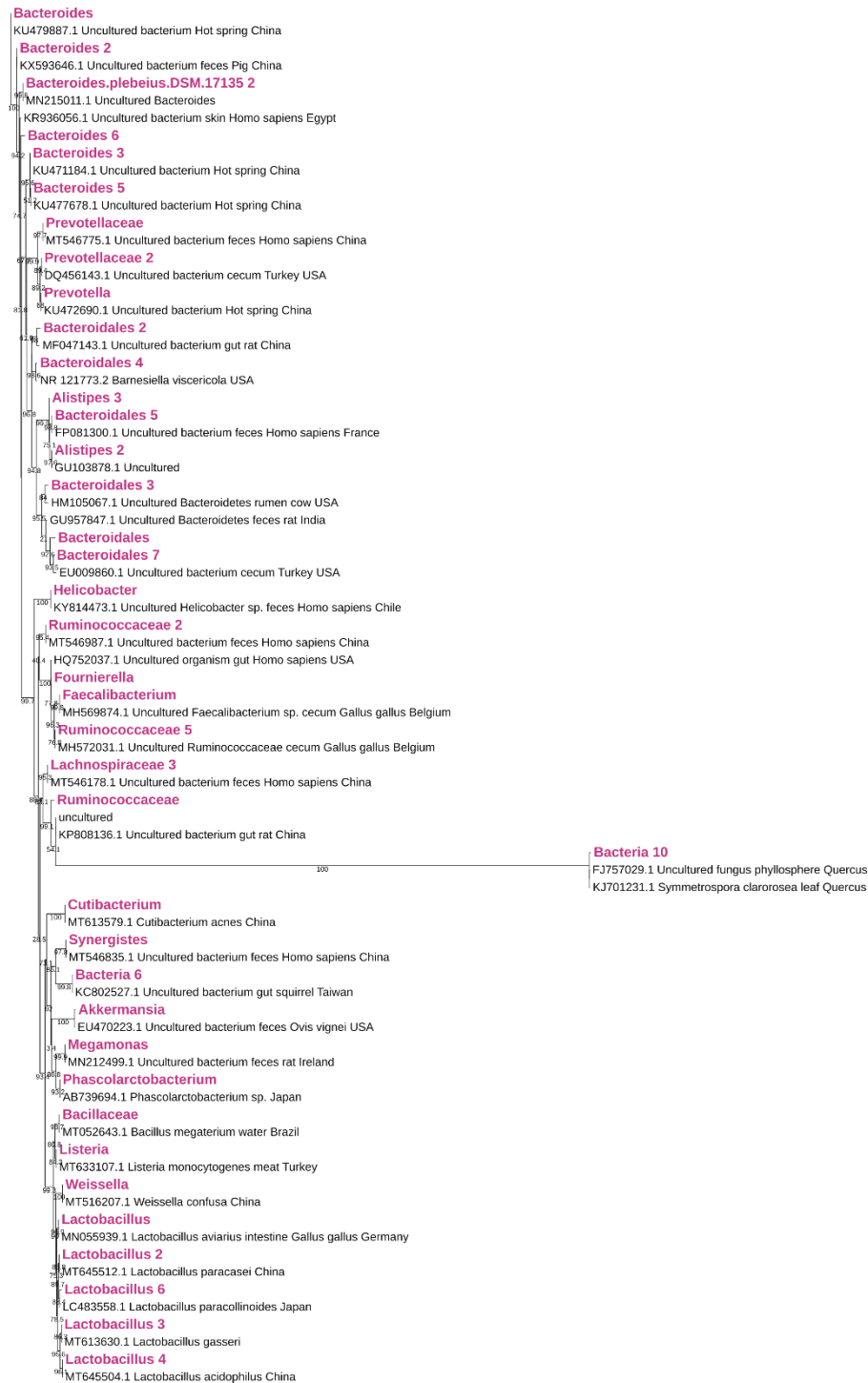


Figure 5 Suppl. 6- Árvore filogenética com ASVs de fungos obtidas nesse estudo (coloridas) e sequencias do Genbank (preta) resultantes da correlação positiva.

Tree scale: 0.1

