

Diversidade fúngica em folhas de dendezeiro com sintomas de Amarelecimento Fatal



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
14**

**Diversidade fúngica em folhas de dendezeiro
com sintomas de Amarelecimento Fatal**

*Ohana Yonara Assis Costa
Daiva Domenech Tupinambá
Jessica Carvalho Bergmann
Cristine Chaves Barreto
Betania Ferraz Quirino*

**Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2018**

Embrapa Agroenergial
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroenergia

Comitê Local de Publicações

Presidente
Alexandre Alonso Alves

Secretária-Executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros
Adilson Kobayashi
André Leão
Dasciana Rodrigues
Emerson Leo Schultz
Felipe Carvalho
Maria Iara Pereira Machado
Thaís Salum
Wesley Leal

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Maria Iara Pereira Machado

Tratamento das ilustrações e editoração
eletrônica
Maria Goreti Braga dos Santos

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Foto da capa
Jéssica Bergmann

1ª edição
Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

Diversidade fúngica em folhas de dendezeiro com sintomas de amarelecimento
fatal / autores, Ohana Yonara Assis Costa ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa
Agroenergia, 2018.

35 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroenergia,
ISSN 2177-0395 ; 14).

1. Dendê. 2. Amarelecimento fatal. 3. Phytophthora. I. Costa, Ohana Yonara
Assis. II. Série.

633.851 – CDD 22.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	10
Resultados.....	14
Discussão	22
Conclusões.....	28
Referências	29
Informação Suplementar	34

Diversidade fúngica em folhas de dendezeiro com sintomas de Amarelecimento Fatal¹

Ohana Yonara Assis Costa²

Daiva Domenech Tupinambá³

Jessica Carvalho Bergmann⁴

Cristine Chaves Barreto⁵

Betania Ferraz Quirino⁶

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma excelente fonte de óleo vegetal para a produção de biodiesel; entretanto, ainda existem limitações para seu cultivo no Brasil, como a ocorrência do Amarelecimento Fatal (AF). O AF tem sido estudado por muitos anos, mas seu agente causal não foi determinado. Na Colômbia e em outros países próximos, foi relatado que o agente causal do AF (*Pudrición del Cogollo*) é o oomiceto *Phytophthora palmivora*, entretanto, vários autores acreditam que o AF e a Pudrición del Cogollo (PC) são doenças distintas. Os principais objetivos deste trabalho foram testar, em palmas de óleo brasileiras, utilizando ferramentas de biologia molecular, a co-ocorrência entre sintomas de AF e o oomiceto *Phytophthora*, assim como caracterizar a diversidade fúngica em folhas com AF e folhas saudáveis por meio de sequenciamento de última geração. Reações de PCR com iniciadores específicos para o gênero *Phytophthora* mostraram amplificação em apenas uma única amostra. A análise da região ITS do DNA ribossômico de fungos mostrou que, ao nível de gênero, diferentes grupos predominaram nas amostras de folhas com sintomas de AF, enquanto *Pyrenochaetopsis* e fungos não classificados predominaram em todas as amostras sem sintomas de AF. Nossos resultados mostram que as comunidades fúngicas são distin-

¹ Este trabalho foi publicado na PlosOne. Doi: 10.1371/journal.pone.0191884

² Biomédica, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, doutoranda no Instituto de Ecologia da Holanda (NIOO-KNAW), Wageningen, Países Baixos, Holanda.

³ Farmacêutica, doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa, Secretaria de Desenvolvimento Institucional, Brasília-DF.

⁴ Bióloga, doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia, colaboradora na Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁵ Bióloga, doutora em Microbiologia, professora da Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

⁶ Bióloga, doutora em Biologia celular e molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

tas entre folhas com AF, mesmo aquelas no mesmo estágio da doença. Este é o primeiro estudo a descrever a evolução de uma comunidade microbiana usando técnicas moleculares de última geração durante o desenvolvimento de uma doença em planta, e também é o primeiro trabalho a utilizar técnicas moleculares independentes de cultivo para descrever as comunidades fúngicas associadas a folhas de dendezeiro com e sem sintomas de AF.

Termos para indexação: dendê, amarelecimento fatal, *Phytophthora*.

Fatal yellowing disease

Characterization of fungal diversity throughout disease progression

Abstract – Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is an excellent source of vegetable oil for biodiesel production; however, there are still some limitations for its cultivation in Brazil such as Fatal Yellowing (FY) disease. FY has been studied for many years, but its causal agent has never been determined. In Colombia and nearby countries, it was reported that the causal agent of Fatal Yellowing (*Pudrición del Cogollo*) is the oomycete *Phytophthora palmivora*, however, several authors claim that Fatal Yellowing and *Pudrición del Cogollo* (PC) are different diseases. The major aims of this work were to test, using molecular biology tools, Brazilian oil palm trees for the co-occurrence of the oomycete *Phytophthora* and FY symptoms, and to characterize the fungal diversity in FY diseased and healthy leaves by next generation sequencing. Investigation with specific primers for the genus *Phytophthora* showed amplification in only one of the samples. Analysis of the fungal ITS region demonstrated that at genus level, different groups predominated in all symptomatic samples, while *Pyrenochaetopsis* and unclassified fungi predominated in all asymptomatic samples. Our results show that fungal communities were not the same between samples at the same stage of the disease or among all the symptomatic samples. This is the first study that describes the evolution of the microbial community in the course of plant disease and also the first work to use high throughput next generation sequencing to evaluate the fungal community associated with leaves of oil palm trees with and without symptoms of FY.

Index terms: oil palm, Fatal Yellowing, *Phytophthora*.

Introdução

O crescimento da economia mundial levou a um aumento no consumo de energia. Felizmente, também tem aumentado a preocupação com impacto ambiental, levando à busca de fontes de energia limpas e renováveis. Para isso, há necessidade de investimento em novas fontes de energia que proporcionem um equilíbrio entre viabilidade econômica e sustentabilidade [Dupont et al., 2015; Brant, 2017].

O Brasil é um líder no setor de bioenergia, tendo uma matriz energética baseada em fontes limpas e renováveis. Em 2016, aproximadamente 44% da matriz energética brasileira era baseada em fontes renováveis como etanol de cana-de-açúcar e energia eólica (Brasil, 2015; Brasil, 2017). A manutenção dessa matriz energética limpa tem estimulado no País pesquisas sobre biocombustíveis, como o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais.

Devido à alta produtividade de óleo por hectare, o dendzeiro se destaca como fonte potencial de óleo para a produção em larga escala de biodiesel no Brasil. Enquanto o coco, a soja, o girassol e outras culturas têm produtividade de óleo entre 120 kg/ha e 1.200 kg/ha, o dendzeiro tem produtividade entre 2.000 kg/ha e 8.000 kg/ha (Bergmann et al., 2013), sendo considerado a cultura oleaginosa com maior produtividade.

O dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma planta perene nativa do oeste africano. No Brasil, a produtividade em 2014 foi de 11.013,6 kg/ha, e 370.000 t de óleo foram produzidas. A Indonésia é o maior produtor mundial de óleo de dendê (FAO, 2015). Embora o óleo de dendê seja uma excelente fonte de óleo vegetal para produção de biodiesel, existem limitações para seu cultivo no Brasil, como a ocorrência do Amarelecimento Fatal (AF) (Bergmann, 2013).

AF é uma doença com sintomas variáveis que promove o apodrecimento da parte apical da planta, tendo causado vasta destruição em plantações de dendzeiro na América Central e América do Sul. Milhares de hectares de dendzeiros foram devastados no Brasil, Equador, Colômbia, Costa Rica, Nicarágua, Panamá e Suriname (De Franqueville, 2003; Corley; Tinker, 2015). Em geral, os primeiros sintomas consistem em aparecimento de coloração amarelo-clara na parte basal dos folíolos intermediários (Brant, 2017; Brasil, 2015; Brasil, 2017; Bergmann et al., 2013) seguida de necrose das bordas,

que depois se propaga para outras áreas da folha (Boari, 2008). A podridão aquosa ou seca se espalha por contato de um folíolo com outro. A podridão, então, se espalha para a folha flecha, frequentemente matando a planta (De Franqueville, 2003; Corley; Tinker, 2015). Entretanto, os sintomas e a severidade da doença variam de acordo com a região geográfica. A doença aparenta ter diferentes taxas de progressão. Por exemplo, progride de forma aguda no Equador e no sudoeste da Colômbia, onde leva apenas 1-2 meses para matar a planta. Já no Brasil e no Suriname, a morte do dendezeiro leva de 1 a 3 anos (Corley; Tinker, 2015). Também existe uma variação da propagação da doença em termos espaciais. Em alguns casos, o AF se espalha inicialmente de maneira linear, mas depois a dispersão se torna exponencial. Em outros casos, não há um padrão de dispersão consistente para o AF, como observado por Bergamin Filho et al. (1998) e Laranjeira et al. (1998) em suas análises.

É importante enfatizar que vários autores acreditam que o AF e a *Pudrición del Cogollo* (PC) são doenças distintas, apresentando diferentes sintomas e evolução. Segundo Ayala (2001), essas doenças são distintas, pois não foi observada podridão fétida nos meristemas dos dendezeiros no Pará. Swinburne (1993) comparou os sintomas entre plantas sintomáticas no Brasil, Colômbia e Equador e observou diferenças na evolução da doença. Por exemplo, nos dendezeiros brasileiros não foi observada podridão aquosa do meristema apical, assim como também não ocorreu remissão da doença nas plantas brasileiras. Zadoks (1990) também chamou atenção para o fato de os sintomas da *Pudrición del Cogollo* na Amazônia equatoriana serem diferentes daqueles do AF no Brasil, embora ambas as doenças possam ser letais.

Embora o AF tenha sido estudado por muitos anos, sua causa não foi determinada, e nenhuma correlação consistente com insetos específicos, problemas fisiológicos, tipo de solo ou patógenos foi encontrada (Boari, 2008). Além disso, não há nenhum tratamento disponível para controlar a doença em plantas afetadas.

Martinez et al. (2010), entretanto, reportaram que o agente causal do AF (*Pudrición del Cogollo*) na Colômbia e países vizinhos é o oomiceto *Phytophthora palmivora*. Nos seus estudos (Martinez et al., 2010; Sarria et al., 2008), *P. palmivora* foi isolado de dendezeiros nos estágios iniciais da

doença usando frutas como armadilhas. Entretanto, uma análise molecular para verificar a presença de *P. palmivora* na microbiota das plantas doentes não foi realizada.

O objetivo deste trabalho foi investigar, com ferramentas de biologia molecular, a ocorrência do oomiceto *Phytophthora* em dendezeiros brasileiros com e sem sintomas de amarelecimento fatal, assim como caracterizar a diversidade fúngica associada às folhas dessas mesmas plantas por meio de sequenciamento de nova geração.

Material e Métodos

Amostras

As amostras de folhas de dendezeiros foram coletadas no Estado do Pará, Brasil, em uma área cultivada com dendezeiros, próxima à cidade de Mojú. Nenhum animal foi utilizado neste estudo. O estudo foi realizado em área privada com a permissão dos proprietários. As amostras de folha foram obtidas de dendezeiros com AF (SP - Symptomatic Plants), e de dendezeiros de uma área sem a ocorrência de AF (AP - Asymptomatic Plants). Os dendezeiros sem sintomas de AF estavam a uma distância de 4 km daqueles com AF. As folhas foram coletadas de dendezeiros com sintomas de AF nos estágios 2, 5 e 8 da doença. A classificação da doença em estágios de 1 a 10 foi proposta por Souza et al. (2000); o estágio 1 é o início dos primeiros sintomas visíveis e o estágio 10 é o de sintomas mais severos. No estágio 2 da doença, as folhas jovens começam a apresentar uma coloração verde pálida e a folha flecha começa a murchar. No estágio 5, começa a aparecer necrose nas pontas das folhas jovens e também daquelas amareladas. No estágio 8 da doença, as folhas mais velhas continuam verde-escuras, mas as folhas jovens têm coloração amarela e verde-pálida, e a maioria das folhas já está seca. As coordenadas geográficas dos locais onde as amostras foram coletadas estão mostradas na Tabela 1. As amostras foram coletadas da segunda folha apical dos dendezeiros. Foram removidos 10 folíolos da extremidade superior, 10 da parte média da folha e 10 da base da folha. Os folíolos foram transportados em gelo seco até o laboratório, onde as amostras foram mantidas a -80 °C até a extração de DNA.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos locais amostrados.

Dendezeiros com Amarelecimento Fatal (SP-Symptomatic Plants)		Dendezeiros sem Amarelecimento Fatal (AP-Asymptomatic Plants)	
SP estágio 2 planta 1 – SP 2.1	S02°00'27.8" W048°38'18.3"	AP 1	S02°00'26.2" W048°35'52.3"
SP estágio 2 planta 2 – SP 2.2	S02°00'27.0" W048°38'18.1"	AP 2	S02°00'24.1" W048°35'52.4"
SP estágio 5 planta 1 – SP 5.1	S02°00'23.8" W048°38'18.6"	AP 3	S02°00'24.1" W048°35'52.3"
SP estágio 5 planta 2 – SP 5.2	S02°00'24.9" W048°38'17.6"	AP 4	S02°00'25.1" W048°35'51.4"
SP estágio 8 planta 1 – SP 8.1	S02°00'25.4" W048°38'16.9"		
SP estágio 8 planta 2 – SP 8.2	S02°00'26.8" W048°38'16.0"		

Extração de DNA total

A extração do DNA total foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle (1990), com modificações. Todos os folíolos de cada planta foram combinados e pulverizados em almofariz com nitrogênio líquido. Foram, então, misturados 2 g de material vegetal com 3 g de esferas de vidro lavadas com ácido (~ 200 µm), 5 mL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% PVP) e 180 µL 20% SDS. As amostras foram incubadas a 65 °C por 30 minutos e, então, vigorosamente agitadas em vórtex em 2 ciclos de 90 segundos com intervalos de 10 segundos. Após esfriar, 4 mL de solução de fenol/clorofórmio (25:24) foram adicionados e as amostras foram centrifugadas a 2.880 xg por 8 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e 4 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram adicionados, ao que se seguiu nova centrifugação conforme detalhado anteriormente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foram adicionados 2/3 desse volume de isopropanol. As amostras foram armazenadas a -20 °C por 16 horas e, subsequentemente, centrifugadas por 10 minutos a 18.000 xg. Após o sobrenadante ser descartado, o pellet foi lavado com 2 mL de etanol 70% e depois foi novamente centrifugado como antes. O pellet foi ressuscitado em 100 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Por fim, 100 µg de

RNase foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Para precipitar o DNA, 5 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2, 50 µL de Tris-HCl pH 8,0 100 mM e 100 µL de etanol 100% gelado foram adicionados às amostras. As amostras foram mantidas a -20 °C por 10 min e depois centrifugadas a 13.400 xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 70% gelado, centrifugado, seco e ressuspendido em 100-300 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

Amplificação da região ITS do rDNA do gênero *Phytophthora*

Para investigar a presença de DNA de oomicetos do gênero *Phytophthora*, DNA total foi usado em reação de PCR com iniciadores específicos para o gênero *Phytophthora*, A2 (5'-ACT TTC CAC GTG AAC CGT TTC AA-3') e I2 (5' GAT ATC AGG TCC AAT TGA GAT GC 3 ') (Drenth et al., 2006). Cada reação de PCR com 20 µL continha tampão de reação 1X (com 1,5 mM MgCl₂), 0,25 mM de cada dNTP, 0,25 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria, Minas Gerais, Brasil), 0,4 ng/µL albumina sérica bovina e aproximadamente 20 ng a 40 ng de DNA metagenômico. As amplificações foram feitas em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Os seguintes parâmetros foram utilizados: desnaturação a 94 °C por 5 minutos seguida de 30 a 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, com um ciclo final a 72 °C por 4 minutos. Como controle positivo, foi usado DNA genômico de *Phytophthora nicotianae* (gentilmente fornecido pelo Dr. Café Filho, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasil). Água ultrapura esterilizada foi adicionada no controle negativo ao invés do DNA.

Amplificação da região ITS fúngica e região 16S do rRNA bacteriano

DNA total foi usado para amplificação da região ITS do rDNA de fungos e do gene codificador do RNA ribossomal 16S do domínio *Bacteria*. Os iniciadores usados foram ITS1F (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA 3 ') (Gardes; Bruns, 1993) e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White et al.,

1990) para fungos; 799F (5' AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') (Chelius; Triplett, 2001) e 1492R (5' GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Stackebrandt; Liesack, 1993) para *Bacteria*. Adaptadores utilizados para iniciação da amplificação e do sequenciamento (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) foram adicionados à extremidade 5' dos iniciadores (adaptador A para os iniciadores *forward*, e adaptador B para os iniciadores *reverse*). Amplificações com o par de iniciadores ITS1F/ITS4 foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 5 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com um ciclo final de extensão a 72 °C por 30 segundos. As condições para amplificação por PCR com o par de iniciadores 799F/1492R foram: desnaturação a 95 °C por 30 segundos seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 5 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com um ciclo final de extensão a 72 °C por 30 segundos. Cada reação de 20 µL continha aproximadamente 20 ng de DNA total, 0,25 µM de cada iniciador, 0,4 ng/µL de albumina sérica bovina e 10 µL de Flash Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Como controle positivo na reação de PCR para amplificação de DNA bacteriano e fúngico, foram usados DNA genômico de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Água ultrapura esterilizada foi utilizada em vez de DNA no controle negativo. Aproximadamente 25 reações foram feitas para cada amostra e os produtos de amplificação foram combinados e purificados com GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 1.000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). O sequenciamento dos produtos de PCR purificados foi realizado em um quarto de placa na plataforma GS FLX Titanium na empresa MacroGen (Coreia do Sul).

Análise de sequências

As sequências foram analisadas com o pacote de softwares Mothur (Schloss et al., 2009). 'Denosing' dos dados brutos foi realizado com a ferramenta shhh.flows, que é uma adaptação do algoritmo PyroNoise (Quince et al., 2011). Os 'barcodes' usados no 'multiplex' e os adaptadores foram removidos, bem como as sequências com menos de 250 pb. Sequências de

Bacteria foram alinhadas utilizando a ferramenta *align.seqs* contra a base de dados SILVA (v128) (Quast et al., 2013). As sequências de fungo foram alinhadas usando a ferramenta *online* para alinhamentos múltiplos *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform* (MAFFT) (Kato; standley, 2013). As quimeras foram removidas com a ferramenta *chimera.uchime*. A classificação filogenética dos microrganismos foi realizada usando a base de dados SILVA (v128) (Quast et al., 2013) para *Bacteria* e a base de dados UNITE para fungos (Kõljag et al., 2013). O número de sequências em cada amostra foi normalizado para o menor número de sequências de todos os grupos. As sequências foram agrupadas em *operational taxonomic units* (OTUs) usando o método de *average-neighbor* e um *threshold* de 3% de distância. Mothur foi usado para calcular os índices de diversidade e riqueza e também para produzir os diagramas de Venn. Para análise de componente principal – *Principal component analysis* (PCA) –, foi usado o software Stamp (Lozupone et al., 2006), e também a análise de variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05. Para os diagramas de Venn, as sequências das amostras foram combinadas de acordo com o estágio da doença ou ausência da doença, produzindo os grupos SP 2 (amostras SP 2.1 e 2.2), SP 5 (amostras SP 5.1 e 5.2), SP 8 (amostras SP 8.1 e 8.2) e AP (AP 7, 8, 9 e 10). As sequências de OTUs apenas compartilhadas por amostras sintomáticas (SP 2, SP5 e SP8) foram inicialmente classificadas com Mothur (Schloss et al., 2009) usando a base de dados UNITE (Kõljag et al., 2013) e, depois, analisadas usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1990), disponível on-line no website do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Resultados

Muitos testes foram feitos com o intuito de produzir amplicons para a região ITS do gênero *Phytophthora* utilizando como molde DNA total extraído de plantas doentes e aparentemente saudas. Entretanto, ocorreu amplificação em apenas uma única amostra (SP 2.1) (Figura S1). PCR usando as mesmas condições também foi feita com DNA do solo da mesma área, obtido da região em volta das plantas e de floresta nativa, concedido por Tupinambá et al. (2016), mas não ocorreu nenhuma amplificação (Figura S2).

O pirossequenciamento da região ITS fúngica gerou 232.869 sequências brutas. Após controle de qualidade e remoção de quimeras, 136.615 sequências maiores que 268 pb restaram para as análises subsequentes. Entre 9.221 e 25.542 sequências de boa qualidade foram obtidas por amostra. Inicialmente, pretendíamos fazer uma análise de diversidade bacteriana, mas, após o sequenciamento, observamos uma alta porcentagem de sequências de cloroplasto em todas as amostras (34,7% - 99% das sequências), ainda que o iniciador 799F (Chelius; Triplett, 2001), desenvolvido originalmente em estudos com microrganismos endofíticos, tenha sido utilizado para evitar sequências de cloroplastos. Sendo assim, apenas a diversidade fúngica associada a dendezeiros com e sem AF foi analisada. As sequências deste trabalho foram depositadas no GenBank com os números de acesso MG244285 - MG245771.

Diversidade fúngica

O número de sequências da região ITS fúngica após feita a normalização dos dados foi de 9.221 sequências por amostra (Tabela 2). Dois filos foram observados nas amostras (Ascomycota e Basidiomycota), bem como 'unclassified fungi' (Figura 1A). O filo Ascomycota foi predominante nas amostras SP 2.1, SP 2.2, SP 5.1, SP 5.2, SP 8.2, AP 1, AP 2, AP 3 e AP 4 (51,8% - 99,9% das sequências), enquanto os 'unclassified fungi' foram predominantes na amostra SP 8.1 (83,1% das sequências).

Tabela 2. Número de sequências, número de 'operational taxonomic units (OTUs)' observadas e índices de riqueza e diversidade de para o reino Fungi em folhas de dendezeiros em diferentes estágios de AF (estágios 2, 5 e 8) ou em folhas assintomáticas (AP).

Sample	No. of seqs.*	OTUs	Chao1 index	ACE**	Shannon index	Inverse Simpson index	Good's coverage estimator
SP 2.1	12,483	107	160.12	195.66	1.24	1.82	0.995
SP 2.2	17,025	166	203.27	203.02	2.83	6.24	0.996
SP 5.1	9,423	37	67.00	108.42	1.59	3.23	0.998
SP 5.2	11,374	155	236.48	307.45	2.29	4.46	0.994
SP 8.1	9,221	101	173.77	219.30	1.16	1.60	0.996
SP 8.2	9,759	88	217.38	342.83	2.14	6.05	0.995
AP 1	20,824	237	325.03	373.47	2.77	5.44	0.992
AP 2	10,874	213	328.56	278.66	3.09	7.74	0.994
AP 3	10,090	97	120.75	131.93	2.61	5.25	0.998
AP 4	25,542	126	180.08	208.85	2.30	3.66	0.995

* Após remoção de quimeras. **ACE: abundance-based coverage estimator.

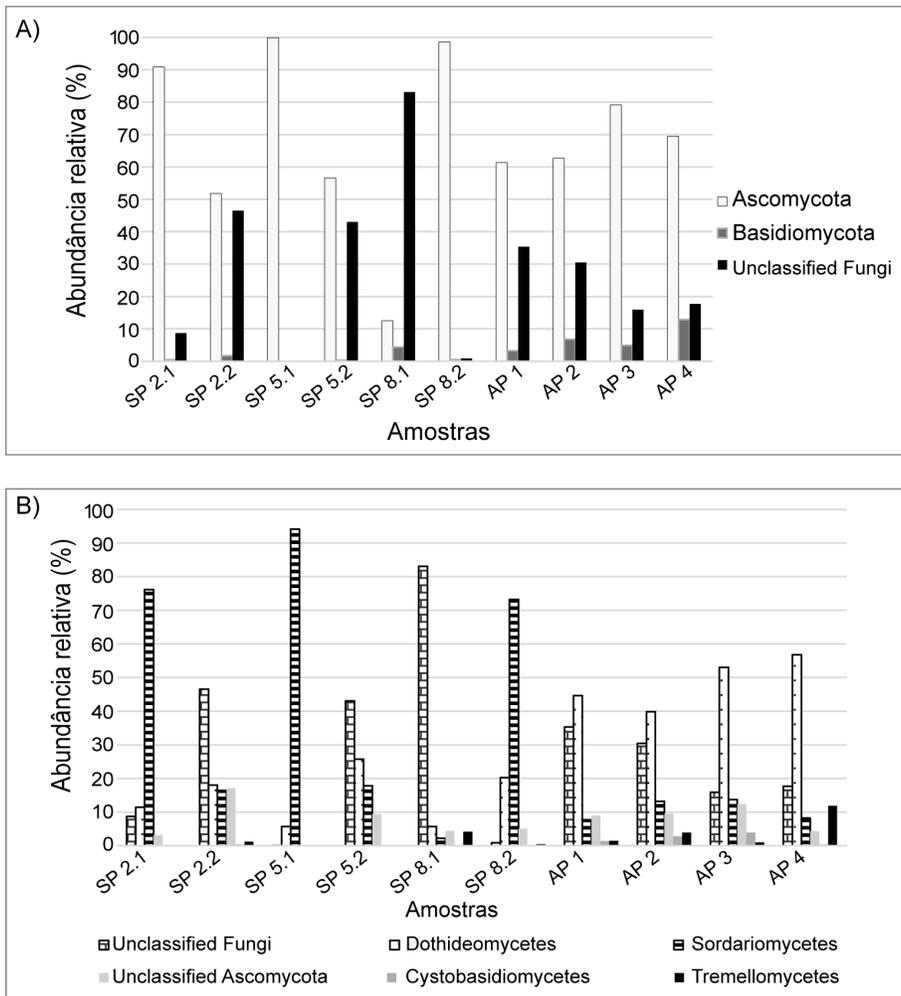


Figura 1. Abundância de sequências em diferentes níveis taxonômicos. Abundância relativa de sequências fúngicas nos níveis de filo (A) e classe (B) em folhas de dendezeiros com AF (nos estágios 2, 5 e 8) ou sem AF segundo análise da região ITS. AP – Plantas sem AF (FY Asymptomatic Plants); SP – Plantas com AF (FY Symptomatic Plants).

Em nível de classe, foi observado um total de 16 grupos. Somente 'unclassified fungi', Sordariomycetes e Dothideomycetes foram altamente abundantes nas amostras (Figura 1B). 'Unclassified fungi' foram os mais abundantes nas amostras SP 2.2, SP 5.2 e SP 8.1 (43% - 83,1% das sequências). Sordariomycetes foram predominantes nas amostras SP 2.1, SP 5.1 e SP 8.2 (73,2% - 94,2% das sequências). Dothideomycetes foram predominantes nas amostras AP 1, AP 2, AP 3 e AP 4 (39,8% - 56,8% das sequências).

Em nível de gênero, foram identificados 97 grupos, incluindo 34 grupos não classificados e 61 gêneros conhecidos. Como mostrado na Figura 2A-2D, 'unclassified fungi' foi o grupo mais abundante nas amostras SP 2.2, SP 5.2 e SP 8.1 (43% - 83,1% das sequências). 'Unclassified Amphisphaeriaceae' foi o grupo predominante na amostra SP 2.1 (75% das sequências), enquanto *Sarocladium* foi o mais abundante em SP 5.1 (49,5% das sequências). *Pyrenochaetopsis* dominou nas amostras AP 1, AP2, AP 3 e AP 4 (32,8% - 50,4% das sequências).

Conforme mostrado na Tabela 2, a amostra que apresentou maior número de OTUs foi AP 1 (237), e aquela com menor número foi SP 5.1 (37). A amostra AP 1 também teve o mais alto valor para o índice de estimativa de riqueza ACE e o mais alto valor de Chao1. A amostra SP 5.1 teve o menor valor de Chao1 e ACE. Em relação aos índices que estimam diversidade, a amostra AP 2 teve o mais alto valor para Shannon e Simpson inverso, enquanto SP 8.1 teve os menores valores para ambos os índices. A cobertura de Good's para todas as amostras foi acima de 99%, indicando que o esforço amostral foi suficiente para cobrir a diversidade existente nas amostras.

O diagrama de Venn das OTUs de fungo a uma distância de 0.03 (Figura 3) mostrou que o grupo AP possui o mais alto número de OTUs exclusivas (281). As amostras das plantas doentes (SP 2, 5 e 8) possuem 5 OTUs em comum, que foram classificadas como 'unclassified Ascomycota' (OTU036 e OTU265), *Fusarium* sp. (OTU078), 'unclassified Basidiomycota' (OTU220) e 'unclassified fungi' (OUT164) (Tabela 3). Após a reclassificação usando BLAST, OTU036 e OTU220 mostraram ter mais alta identidade de sequência com 'unclassified uncultured fungus', OTU078 com *Fusarium solani*, OTU165 com *Hannaella oryzae* e OTU265 com *Colletotrichum citri*.

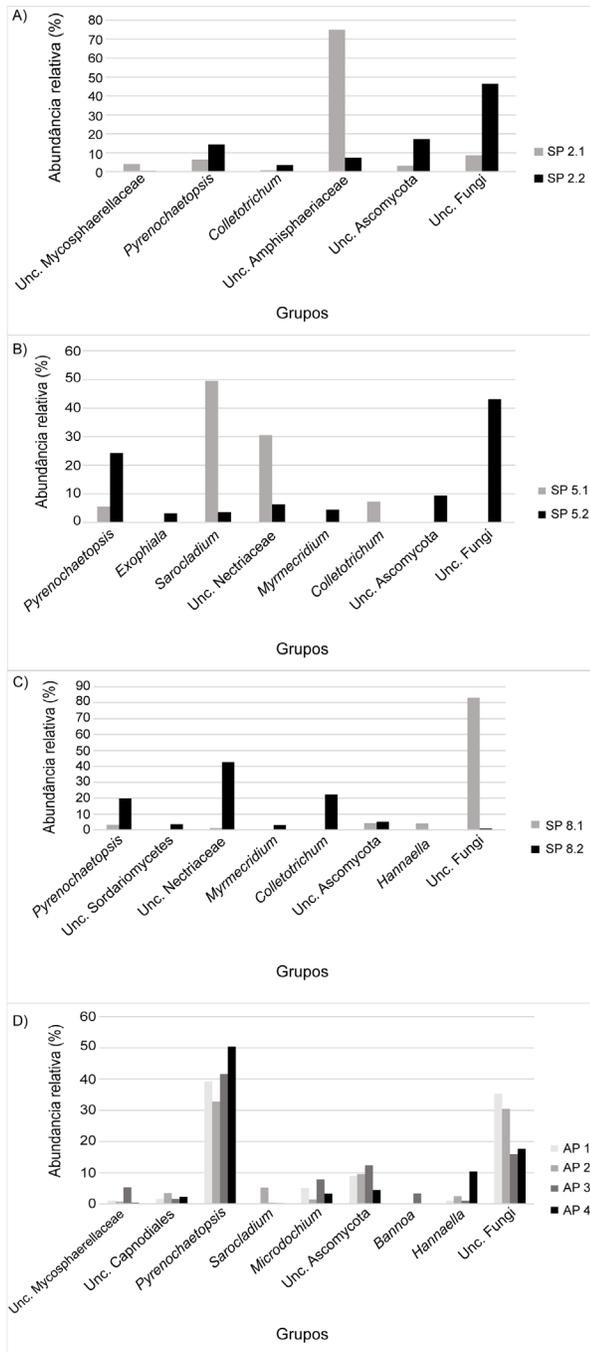


Figura 2. Abundância dos gêneros de fungo. Abundância relativa das seqüências fúngicas em nível de gênero e folhas de dendezeiros com AF (nos estágios 2, 5 e 8) ou sem AF de acordo com a análise da região ITS. (A) Amostras no estágio 2 de AF; (B) Amostras no estágio 5 de AF; (C) Amostras no estágio 8 de AF; (D) Amostras assintomáticas. (AP - FY Asymptomatic Plants ou plantas sem AF; SP - FY Symptomatic Plants ou plantas com AF).

Tabela 3. Identificação de OTUs de fungo compartilhadas pelas amostras de folhas afetadas por AF nos estágios da doença 2, 5 e 8, mas não presente em folhas de dendezeiros assintomáticos.

Sequence ID	OTU number	Identity (%)	Genus and Genbank accession #
JPNQ46G03CYILX	OTU036	91%	Uncultured fungus KT328713.1
JPNQ46G03CXECX	OTU078	99%	<i>Fusarium solani</i> KF030977.1
JPNQ46G03DPCVE	OTU165	97%	<i>Hannaella oryzae</i> KU182505.1
JPNQ46G03DAF46	OTU220	94%	Uncultured fungus KU582345
JPNQ46G03C3ZYL	OTU265	100%	<i>Colletotrichum citri</i> KX670382.1

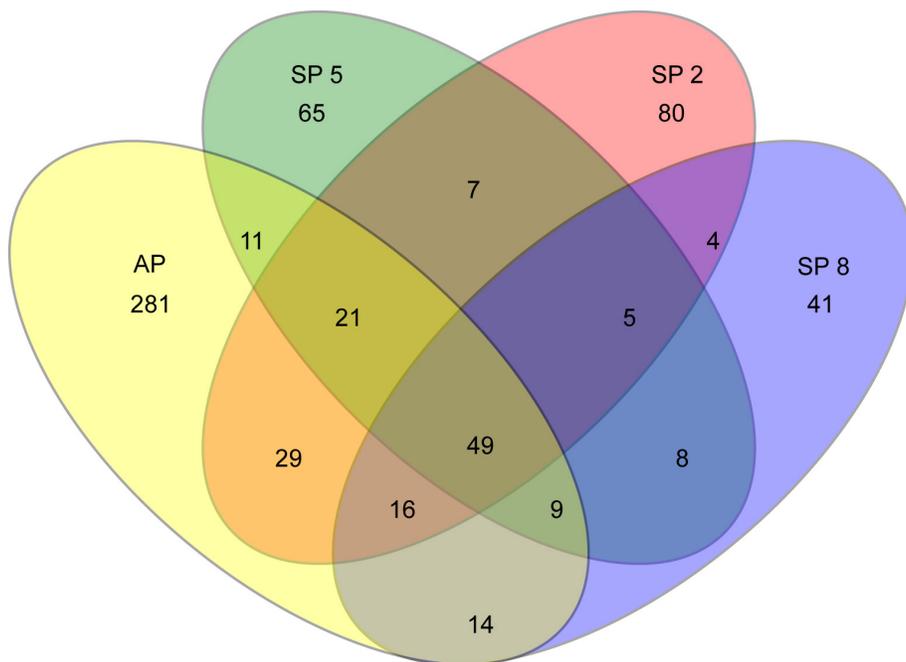


Figura 3. Venn diagram. O número de OTUs fúngicas (usando uma distância de 3%) compartilhadas e não compartilhadas entre os grupos de amostras de folhas em diferentes estágios de AF (estágio 2, estágio 5 e estágio 8) e plantas saudáveis (AP) são mostradas.

Os resultados de PCA (Figura 4) e ANOVA (P -value > 0.05) mostraram que uma OTU fúngica causou a dispersão dos grupos no gráfico: *Pyrenochaetopsis* (maior abundância relativa no grupo AP – 40,7%). Os gráficos PCA também mostram que as amostras de plantas assintomáticas compartilham mais similaridades entre si, se agrupando no gráfico, enquanto as amostras de plantas com AF se mostraram espalhadas nos gráficos.

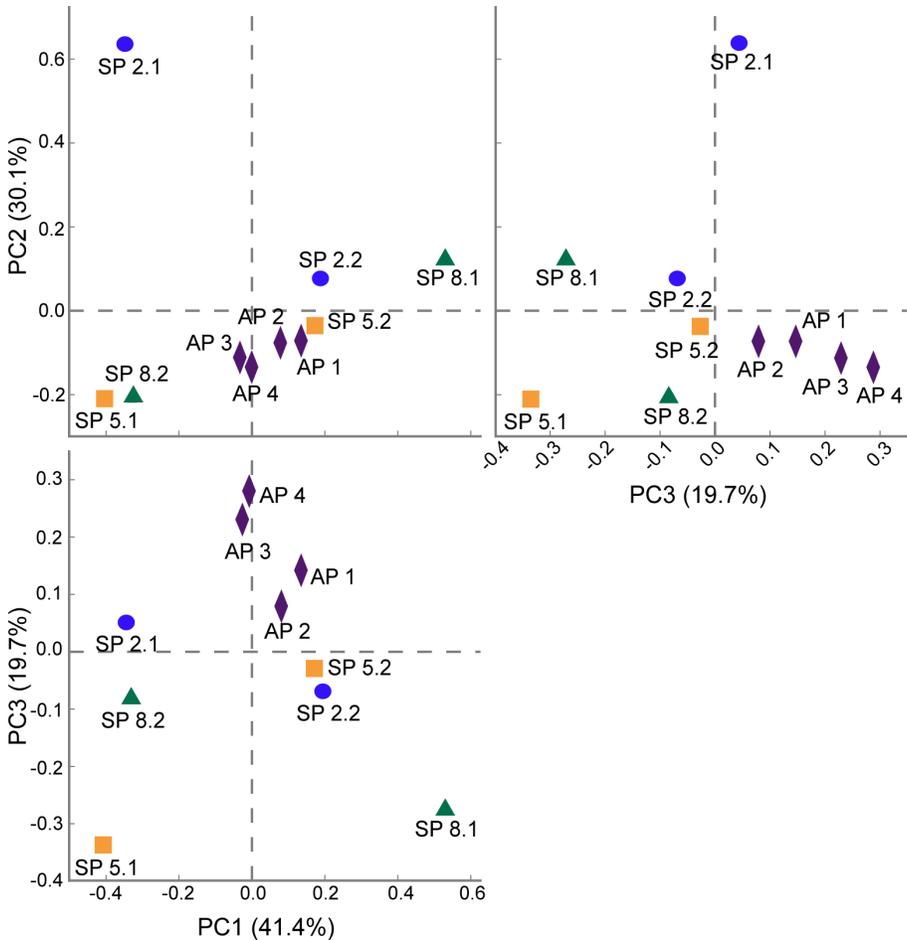


Figura 4. Análise de Componente Principal (PCA) das OTUs de fungo ao nível de gênero. Pares de gráficos dos três componentes principais baseados na análise dos grupos de plantas com e sem sintomas (PC1 e PC2 são responsáveis por 71,5% da variação entre os grupos de amostras).

Discussão

AF é uma doença de importância econômica que afeta dendezeiros no Brasil. Entretanto, mesmo depois de anos de estudo, o seu agente causal permanece desconhecido. Tanto fatores bióticos quanto abióticos foram correlacionados à doença, e diferentes possibilidades foram exploradas como agentes etiológicos do AF. Insetos (Celestino Filho et al., 1993), viroides e RNAs semelhantes a viroides (Beuther et al., 1992), nematoides (Guevara; Nieto Paez, 1999) e fitoplasmas foram avaliados, mas nenhum desses organismos teve demonstrada uma relação direta com a doença.

Fungos e bactérias também foram relacionados ao AF. *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* spp., *Helminthosporium* sp., *Diplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Pseudallescheria* sp. e *Lasiodiplodia* sp. foram isolados de plantas com AF, mas nenhum destes reproduziu a doença quando reinoculados em plantas (Boari et al., 2012). Bactérias pertencentes ao gênero *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Bacillus* também foram isoladas de dendezeiros afetados pela *Pudrición del Cogollo*, mas os resultados de testes de inoculação não demonstraram a reprodução da doença (Sarria et al., 2008; Silva, 1989).

Na Colômbia, entretanto, Nieto Paez et al. (1996) afirmou que PC é causada por um complexo de três patógenos, *Thielaviopsis* sp., *Fusarium solani* e *Pythium*, concluindo ainda em outro estudo que *Thielaviopsis* cumpria os postulados de Koch e era o agente causal da doença (Nieto Paez et al., 1996). Também na Colômbia, Sarría et al. (2008) isolaram *Phytophthora palmivora* a partir de dendezeiros doentes e, após testes de patogenicidade, concluíram que este oomiceto é responsável pelas lesões iniciais do PC. Depois disso, Martinez et al. (2010), reisolaram *P. palmivora* de dendezeiros e reafirmaram que *P. palmivora* é o agente causal da PC. Torres et al. (2010) e Sarría-Villa et al. (2013) afirmaram que *P. palmivora* cumpria os postulados de Koch, novamente afirmando que este oomiceto é o agente causal da *Pudrición del Cogollo* na Colômbia. Além disso, Torres et al. (2008) acreditam que as lesões iniciais da PC em dendezeiros podem estar relacionadas a insetos da família Tettigoniidae, por meio da produção de lesões nas folhas flecha e do transporte de estruturas reprodutivas do *P. palmivora*. No

Equador, entretanto, Narváez (Ronquillo Narváez, 2012) estudou microrganismos em dendezeiros com PC e não isolou *P. palmivora*, nem detectou este patógeno por DAS-ELISA. O autor encontrou alguma evidência desse patógeno em apenas duas amostras, utilizando uma fita imunológica. Neste trabalho, inicialmente investigamos se *P. palmivora* poderia ser o agente causal do AF que acomete dendezeiros no Brasil. Para isso, iniciadores gênero-específico para *Phytophthora* foram usados para tentar amplificar o DNA desse oomiceto a partir de folhas de dendezeiros nos três estágios da doença estudados e em plantas sem sintomas de AF. Um produto de amplificação foi obtido em apenas uma única amostra, de maneira similar ao que ocorreu no estudo de Narváez (Ronquillo Narváez, 2012), em que fitas imunológicas foram utilizadas e foram detectados oomicetos do gênero em apenas 2 de 33 plantas amostradas. No nosso trabalho não é possível afirmar que o DNA amplificado foi de *P. palmivora*, pois o par de iniciadores usados não era específico para essa espécie. Amplificação também não ocorreu quando o DNA extraído do solo que circundava dendezeiros com e sem sintomas da doença foi utilizado. Além disso, *P. palmivora* nunca foi isolado de dendezeiros com Amarelecimento Fatal no Brasil (Boari et al., 2013). Esses dados dão suporte a autores como Ayala (2001), Zadoks (1990) e Swinburne (1993), que afirmam que o AF e a PC da Colômbia são doenças distintas. No Brasil, *P. palmivora* foi associado a podridão-de-raízes e frutos de mamão (Carnaúba et al., 2006), mas não ao AF.

Ainda que o AF tenha sido estudado por muitos anos, nenhum trabalho utilizou sequenciamento de alto desempenho para descrever a comunidade microbiana associada a folhas de plantas doentes e nem mesmo de plantas saudáveis. A maioria dos trabalhos relacionados a dendezeiros focaram nos frutos, sementes, raízes ou solo, uma vez que esses componentes têm importância para a agroindústria (Pinruan et al., 2010). Tupinambá et al. (2016), entretanto, utilizaram pirosequenciamento para estudar as comunidades de arqueia em solo da Amazônia cultivado com dendezeiros. Além disso, a maioria dos estudos que avaliaram microrganismos associados com dendezeiros descreve o isolamento de fungos a partir de plantas doentes utilizando técnicas clássicas de microbiologia, numa tentativa de identificar o agente etiológico de doenças que acometem dendezeiros.

Rodrigues (1994) estudou fungos endofíticos de folhas e plântulas da palmeira Amazônica *Euterpe oleraceae*, tendo isolado 57 espécies. Os fungos

mais comuns foram *Xylaria cubensis* e *Letendraeopsis palmarum*. O autor concluiu que diferentes partes da palmeira possuem diferentes comunidades de endofíticos. Fröhlich et al. (2000) isolaram 48 gêneros de fungos endofíticos associados a seis palmeiras *Licuala* sp. e observaram que as comunidades eram dominadas por *Xylaria* sp. Treu (1998) isolou aproximadamente 50 espécies de fungos a partir de diferentes partes das plantas, como frutos e caule da planta, no sudeste da Ásia. Entre os gêneros de fungo identificados, havia *Ganoderma*, *Humphreya*, *Picnoporus*, *Rigidoporus*, *Gymnopilus* e *Pleutorus*. Rungjindamai et al. (2008) isolaram, na Tailândia, 340 endofíticos a partir de folhas saudáveis, ráquis e pecíolos de *Elaeis guineensis*. Os autores então caracterizaram 13 basidiomicetos que pertenciam aos gêneros *Schizophyllum*, *Pycnoporus* e *Fomitopsis*. Posteriormente, Pinruan et al. (2010) caracterizaram outros sete isolados que foram identificados como *Schizophyllum* (1), *Pycnoporus* (2), *Fomitopsis* (1), *Trametes* (2) e *Perenniporia* (1).

O pirosequenciamento gerou 136.615 sequências da região ITS com boa qualidade. O número de sequências ITS obtido foi suficiente para cobrir mais de 99% da diversidade presente nas amostras estudadas. Ainda que amostras assintomáticas tenham sido utilizadas neste estudo para comparação, não é possível afirmar que essas plantas estavam completamente livres da doença, uma vez que o agente etiológico não é conhecido. Entretanto, as amostras assintomáticas foram coletadas a 4 km da área onde havia plantas doentes, sendo esta área aparentemente livre de AF.

Neste estudo, ao nível de gênero, diferentes grupos predominaram nas amostras com AF (SP2.1-SP 8.2) (Figuras 2A, 2B e 2C), enquanto dois grupos (*Pyrenochaetopsis* e unclassified fungi) predominaram em todas as amostras assintomáticas (AP1-AP 4) (Figura 2D). As comunidades fúngicas não foram consistentes entre as amostras no mesmo estágio da doença ou entre todas as amostras doentes. Essa tendência foi confirmada pela análise de PCA, em que as amostras assintomáticas (AP 1- AP4) se apresentaram próximas no gráfico, enquanto as amostras sintomáticas (SP2.1-SP 8.2) não se agruparam (Figura 4). A comunidade fúngica das plantas doentes não é estável, e nenhum táxon de fungo teve sua proporção relativa aumentada em todas as plantas doentes. Esse resultado sugere que, à medida que a doença progride, diferentes microrganismos podem predominar, de maneira que as comunidades microbianas presentes não são as mesmas em plantas

em mesmo estágio da doença. Assim, as mudanças ocorridas na composição da comunidade fúngica talvez sejam um efeito secundário da doença e não a causa primária.

No estágio 2 da doença (Figura 2A), unclassified *Amphisphaeriaceae* (SP 2.1) e unclassified Fungi (SP 2.2) foram predominantes. *Amphisphaeriaceae* é uma importante família de ascomicetos da ordem *Xylariales*, à qual pertencem alguns fitopatógenos fracos e espécies endofíticas (2003). Quadros et al. (2015) avaliou a diversidade genética fúngica da família *Amphisphaeriaceae* de dendezeiros do Estado do Pará. Os autores isolaram nove fungos de dendezeiros com AF que apresentavam lesões características do gênero *Pestalotiopsis* e sequenciaram a região ITS desses isolados. A análise das sequências revelou que os isolados pertenciam ao gênero *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. A presença de lesões causadas por fungos desse gênero parecem ser comuns em plantações de dendezeiros, assim como a presença de membros da família *Amphisphaeriaceae* de maneira geral (Quadros et al., 2015). Boari et al. (2012), entretanto, observou que *Pestalotiopsis* não foi capaz de causar AF quando inoculado em dendezeiros.

No estágio 5 da doença (Figura 2B), *Sarocladium* (SP 5.1) e unclassified fungi (SP 2.2) foram os mais abundantes. *Sarocladium* é um gênero de fungos que abriga aproximadamente 10 espécies, incluindo importantes fitopatógenos, bem como patógenos humanos oportunistas. A espécie-tipo do gênero é *Sarocladium oryzae*, agente etiológico da podridão da bainha do arroz (Giraldo et al., 2015).

No estágio 8 de AF (Figura 2C), unclassified fungi (SP 8.1) e unclassified *Nectriaceae* (SP 8.2) foram os grupos predominantes. A família *Nectriaceae* inclui vários fitopatógenos e patógenos humanos importantes, bem como espécies exploradas na indústria como biodegradadoras e agentes de biocontrole. A maioria desses fungos são saprófitos de solo, alguns fracos, outros virulentos, alguns fitopatógenos facultativos e outros obrigatórios (Lombard et al., 2015).

Em adição aos grupos mais abundantes, *Colletotrichum*, um fitopatógeno importante, apareceu como grupo predominante em amostras de folhas com AF SP 2.2, 5.1 e 8.2 (Figura 2), e é semelhante a uma das OTUs que foi encontrada exclusivamente em folhas com AF (Tabela 3). Esse gênero possui

patógenos que causam antracnose em diferentes espécies de plantas lenhosas e herbáceas (Cannon et al., 2012). Outro fitopatógeno encontrado entre as OTUs exclusivamente presentes em plantas com AF foi *Fusarium*, um gênero que causa queimas, podridões de raízes e murchas de importância econômica em várias espécies de plantas (Ma et al., 2010). Fungos comumente encontrados em superfícies foliares, como *Hannaella* e *Exophiala* (Landell et al., 2014), também foram encontrados (Figura 2). A quantidade de sequências não classificadas em todas as amostras mostra que ainda existe uma grande parcela da diversidade fúngica de dendezeiros que é desconhecida, apesar dos vários estudos baseados em técnicas de cultivo tradicionais. Entre os gêneros predominantes nas amostras de folhas com AF, *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Pestalotiopsis* (*Amphisphaeriaceae*), apesar de serem patogênicos, já foram inoculados em dendezeiros, mas não reproduziram a doença (Boari et al., 2013). Ainda que esses fitopatógenos tenham sido descartados como agentes etiológicos do AF, esses gêneros podem ser responsáveis por efeitos secundários do AF, atuando como patógenos oportunistas que aumentam a severidade da infecção. O gênero *Sarocladium* inclui importantes fitopatógenos, entretanto, seu isolamento a partir de dendezeiros com AF não foi reportado. Além disso, foram encontradas várias sequências não classificadas em todas as amostras, tanto nas sem sintomas de AF quanto nas com sintomas de AF. Assim, o agente etiológico do AF ainda pode estar entre os gêneros desconhecidos de fungos.

Nas amostras de folha sem sintomas de AF, *Pyrenochaetopsis* e unclassified fungi foram os grupos mais abundantes (Figura 2d). O gênero *Pyrenochaetopsis* foi introduzido para acomodar várias espécies previamente classificadas como *Phoma* e *Pyrenochaeta*, que são fungos de solo geralmente associados com gramíneas (De Gruyter et al., 2010). Esse gênero também foi encontrado como endófito em folhas sadias de *Cocos nucifera* (Oliveira, 2014).

Os diagramas de Venn (Figura 3) mostraram que o número de OTUs fúngicas exclusivamente associadas a um dos estágios do AF, comparado com as amostras sem sintomas de AF (AP-281 OTUs exclusivas), diminuiu à medida que a doença evoluiu (p.ex., foram 80 OTUs exclusivas no estágio 2 do AF e apenas 41 OTUs exclusivas no estágio 8 da doença). Esse tipo de dinâmica é similar à de sucessão de comunidades em madeira em deterioração, em que, nos estágios mais avançados de decomposição da madeira, tanto a atividade

fúngica quanto a diversidade da comunidade diminuem (Kielak et al., 2016; Kwasna et al., 2016). Entre as OTUs que não estavam presentes nas folhas sem sintomas de AF e que são compartilhadas pelas amostras de folhas de todos os estágios da doença, apenas três puderam ser classificadas, e estas pertenciam aos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Hannaella* (Tabela 3). Tanto *Fusarium* quanto *Colletotrichum* já foram inoculados em dendezeiros, mas as plantas não desenvolveram AF (Silva, 1989; Boari et al., 2013). O gênero *Hannaella* ainda não foi relacionado a doenças em plantas e é comumente encontrado em superfícies foliares (Kaewwichian et al., 2015). Duas OTUs exclusivas de amostras com AF não foram classificadas como gêneros conhecidos. Entretanto, para ser(em) apontado(s) como agente responsável pelo AF, o postulado de Koch deve ser cumprido, no qual os microrganismos devem ser isolados, caracterizados e, após inoculação em dendezeiros saudáveis, a doença deve ser reproduzida.

Esses resultados sugerem que, à medida que a doença evolui, o material vegetal apodrecido produzido pelas espécies colonizadoras iniciais gera metabólitos que selecionam as novas espécies colonizadoras de maneira que a comunidade fúngica se modifica. Assim, a composição da comunidade fúngica nos estágios mais avançados da doença depende da sequência de espécies que estabeleceram hábitat na folha anteriormente, uma vez que a produção de metabólitos pode facilitar ou prevenir o estabelecimento das espécies tardias (Dickie et al., 2012; Holmer et al., 1997). Assim, a colonização da folha por diferentes espécies nos estágios iniciais da doença em diferentes plantas pode explicar a variação nas comunidades fúngicas entre plantas distintas, mas no mesmo estágio da doença. Entretanto, o patógeno responsável pela produção das lesões primárias na folha ainda precisa ser determinado.

Como a variação na comunidade microbiana depende de qual microrganismo se estabelece primeiro, a melhor estratégia para determinar o agente etiológico do AF seria combinar técnicas de microbiologia clássica a outras de biologia molecular para estudar os primeiros estágios da doença. Nos estágios mais avançados do AF, o tecido vegetal provavelmente já está infectado por microrganismos oportunistas.

Conclusões

O dendezeiro é uma planta economicamente importante e tem potencial como matéria-prima para produção de biodiesel, sendo, entretanto, afetado pelo Amarelecimento Fatal. Mesmo após muitos anos de estudo, o agente etiológico do AF não foi inequivocamente identificado. Ainda que o agente causador da *Pudrición del Cogollo* na Colômbia tenha sido apontado como o *Phytophthora palmivora*, este microrganismo nunca foi isolado de dendezeiros com AF no Brasil. Neste estudo, o DNA de microrganismos do gênero *Phytophthora* foi amplificado a partir de uma única amostra de 10 amostras testadas, o que dá suporte à ideia de o AF no Brasil e a *Pudrición del Cogollo* na Colômbia não serem a mesma doença e de o AF não ser causado por *P. palmivora*. Este é o primeiro trabalho a utilizar sequenciamento de última geração para caracterizar a comunidade fúngica associada a folhas de dendezeiros com e sem sintomas de Amarelecimento Fatal. A análise de sequências da região ITS demonstrou que dendezeiros apresentando sintomas de AF não possuem uma microbiota fúngica comum, o que indica que provavelmente a doença leva a um desequilíbrio da microbiota fúngica, que apresenta vários patógenos oportunistas nos estágios mais avançados da doença. Ainda que não seja possível confirmar que plantas assintomáticas estejam completamente saudas, as comunidades fúngicas desses dendezeiros apresentaram mais semelhanças entre si na composição de suas microbiotas fúngicas que folhas de dendezeiros com AF. Essa é uma observação interessante, tendo em vista que este é o primeiro estudo a descrever a evolução da microbiota fúngica usando técnicas moleculares independentes de cultivo durante estágios da doença. Novos estudos com plantas nos estágios iniciais da doença serão necessários para explorar a possibilidade de outros grupos taxonômicos (p.ex., *Bacteria* e *Archaea*) serem agentes causais do AF, tendo em vista que plantas nos estágios mais avançados da doença são dominadas por microrganismos oportunistas.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AYALA, L. S. Relatório de visita à Denpasa (1999). In: PESQUISA sobre amarelecimento fatal do dendezeiro. Belém, DENPASA, 2001. p. 319.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARAJEIRA, F. F.; BERGER, R. D.; HAU, B. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 391-396, 1998.
- BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O.Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.
- BEUTHER, E.; WIESE, U.; LUKAS, N.; VAN SLOBBE, W. G.; RIESNER, D. Fatal yellowing of oil palms: search for viroids and doubled-stranded RNA. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, v. 136, n. 4, p. 297-311, 1992.
- BOARI, A. D. J.; ISHIDA, A. K. N.; HALFELD, B. A.; TREMACOLDI, C. R.; OLIVEIRA, E.; EIRAS, M. **Estudos dos fitopatógenos associados ao amarelecimento fatal da palma de óleo (Elaeis guineensis Jacq.)**. Trabalho não publicado. Apresentado em Seminário na Embrapa.
- BOARI, A. de J. **Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (Elaeis guineensis Jacq.) no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 62 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 348).
- BOARI, A. J.; TEIXEIRA, W. G.; VENTURIERI, A.; MARTORANO, L.; TREMACOLDI, C. R.; CARVALHO, K. B. Avanços nos estudos sobre o amarelecimento fatal da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Tropical Plant pathology**, v. 37, 2012. Suplemento. Edição dos Resumos do 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus, 2012.
- BRANT, L. N. C. (Coord.). **Sustainable development and energy matrix in latin america: the universal clean energy accessibility**. Belo Horizonte: Konrad-Adenauer-Stiftung, 2017.
- BRASIL. Portal Brasil. **Energia renovável representa mais de 42% da matriz energética brasileira**. Publicação: 30/11/2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2015/11/energia-renovavel-representa-mais-de-42-da-matriz-energetica-brasileira>>. Acesso em: outubro 2017.
- BRASIL. Portal Brasil. **Renováveis devem manter participação de 43% na matriz energética em 2017**. Publicação: 30/03/2017. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticias/-/asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/renovaveis-devemmanter-participacao-de-43-na-matriz-energetica-em-2017>. Acesso em: outubro 2017.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. Colletotrichum – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.
- CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; FURTADO, D. C. D. M.; SILVA, I. O.; SILVA, K. M. M. D.; AMORIM, E. P. D. R. Phytophthora palmivora, agente da podridão de raiz e frutos de mamoeiro no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 134-135, 2006.
- CELESTINO FILHO, P.; LOUISE, C.; LUCCHINI, F. Estudos de transmissão do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq), com insetos suspeitos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 1993.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. H. Diseases of the oil palm. In: CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. H. **The oil palm**. 5. ed. Oxford: Wiley, 2015.

DE FRANQUEVILLE, H. Oil palm bud rot in Latin America. **Experimental Agriculture**, v. 39, n. 3, p. 225-240, 2003.

DE GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J. H. C.; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 1066-1081, 2010.

DICKIE, I. A.; FUKAMI, T.; WILKIE, J. P.; ALLEN, R. B.; BUCHANAN, P. K. Do assembly history effects attenuate from species to ecosystem properties? A field test with wood-inhabiting fungi. **Ecology Letters**, v. 15, n. 2, p. 133-141, 2012.

DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DRENTH, A.; WAGELS, G.; SMITH, B.; SENDALL, B.; O'DWYER, C.; IRVINE, G.; IRWIN, J. A. G. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 2, p. 147-159, 2006.

DUPONT, F. H.; GRASSI, F.; ROMITTI, L. Energias renováveis: buscando por uma matriz energética sustentável. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 1, p. 70-81, 2015.

FAO. FAOSTAT. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: outubro 2017.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, 2000.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GIRALDO, A.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; MADRID, H.; DE HOOG, G. S.; CANO, J.; GUARRO, J. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). **Persoonia**, v. 34, p. 10-24, 2015.

GUEVARA, L. A. Á.; NIETO PAEZ, L. E. Nematodos asociados con palmas de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) afectadas con pudrición de cogollo. **Revista Palmas**, v. 20, n. 1, p. 93-99, 1999.

HOLMER, L.; RENVALL, P.; STENLID, J. Selective replacement between species of wood-rotting basidiomycetes, a laboratory study. **Mycological Research**, v. 101, Pt. 6, p. 714-720, 1997.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Molecular systematics of the Amphisphaeriaceae based on cladistic analyses of partial LSU rDNA gene sequences. **Mycological Research**, v. 107, n. 12, p. 1392-1402, 2003.

KAEWICHIAN, R.; LIMTONG, S.; AM-IN, S.; JINDAMORAKOT, S.; SIPICZKI, M. *Hannaella siamensis* sp. nov. and *Hannaella phetchabunensis* sp. nov., two new anamorphic basidiomycetous yeast species isolated from plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, Pt. 4, p. 1297-1303, 2015.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

- KIELAK, A. M.; SCHEUBLIN, T. R.; MENDES, L. W.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. Bacterial Community Succession in Pine-Wood Decomposition. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 231, 2016.
- KÖLJALG, U.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A. F. S.; BAHRAM, M.; WEISS, M.; LARSSON, K.-H. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 21, p. 5271-5277, 2013.
- KWAŚNA, H.; MAZUR, A.; ŁABĘDZKI, A.; KUŹMIŃSKI, R.; ŁAKOMY, P. Communities of fungi in decomposed wood of oak and pine. **Forest Research Papers**, v. 77, n. 3, p. 261-275, 2016.
- LANDELL, M. F.; BRANDAO, L. R.; BARBOSA, A. C.; RAMOS, J. P.; SAFAR, S. V. B.; GOMES, F. C. O.; ROSA, C. A.; VALENTE, P. *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, Pt. 6, p. 1970-1977, 2014.
- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A. L.; A, BERGER, R. D.; HAU, B. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 397-403, 1998.
- LOMBARD, L.; VAN DER MERWE, N. A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Generic concepts in Nectriaceae. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 189-245, 2015.
- LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac-an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, v. 7, artigo 371, 2006.
- MA, L.-J.; VAN DER DOES, H. C.; BORKOVICH, K. A.; COLEMAN, J. J.; DABOUSSI, M.-J.; DI PIETRO, A.; KISTLER, H. C.; REP, M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 367-373, 2010.
- MARTÍNEZ, G.; SARRIA, G. A.; VARÓN, F. *Phytophthora palmivora* es el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite. **Revista Palmas**, v. 31, tomo especial, p. 334-344, 2010.
- MELLO, F. O. T. de; PAULILLO, L. F.; VIAN, C. E. de F. Biodiesel no Brasil: panorama, perspectivas e desafios. **Informações Econômicas**, v. 37, n. 1, p. 28-40, 2007.
- NIETO PAEZ, L. E.; CUERVO, P. L. G.; TOVAR, C. L. Identificación y reproducción del complejo Pudrición de Cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Revista Palmas**, v. 17, n. 2, p. 63-67, 1996.
- OLIVEIRA, R. J. V. D. **Diversidade e identificação de fungos endofíticos em folhas de Cocos nucifera L., em Goiana Pernambuco, com base em morfologia e sequências de rDNA**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.
- PINRUAN, U.; RUNGJINDAMAI, N.; CHOYEYKLIN, R.; LUMYONG, S.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Occurrence and diversity of basidiomycetous endophytes from the oil palm, *Elaeis guineensis* in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 71-88, 2010.
- QUADROS, A. F. F.; BOARI, A. de J.; CARVALHO, T. P.; SILVA, C. T. B. da. Diversidade genética de fungos da família Amphisphaeriaceae na palma de óleo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 3., 2015, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2015. p. 42-45.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; GLOECKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, edição D1, p. D590-D596, 2013.

QUINCE, C.; LANZEN, A.; DAVENPORT, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 38, p. 38, 2011.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, n. 3, p. 376-385, 1994.

RONQUILLO NARVÁEZ, M. P. **Etiología de la Pudrición del Cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* jacq.) en el Ecuador**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico.

RUNGJINDAMAI, N.; PINRUAN, U.; CHOYKLIN, R.; HATTORI, T.; JONES, E. B. G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 139-161, 2008.

SARRIA, G. A.; TORRES, G. A.; AYA, H. A.; ARIZA, J. G.; RODRÍGUEZ, J.; VÉLEZ, D. C.; et al. Phytophthora sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia. **Revista Palmas**, v. 29, edição especial, p. 31-41, 2008.

SARRIA-VILLA, G. A.; MARTÍNEZ, G.; VARÓN, F.; DRENTH, A.; GUEST, D. I. Nuevas evidencias del cumplimiento de los Postulados de Koch en el estudio de las relaciones entre *Phytophthora palmivora* y la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite. **Revista Palmas**, v. 34, n. 4, p. 73-83, 2013.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SILVA, H. M. M. **Relatório de avaliação dos trabalhos com amarelecimento fatal**. Belém: 1989. p. 5. Relatório não publicado.

SOUZA, R. L. R.; VEIGA, A. S.; RAMOS, E. J. A. **Amarelecimento fatal do dendezeiro: identificação prática**. Belém: DENPASA, 2000. 27 p.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. **Nucleic acids and classification: handbook of new bacterial systematics**. London: Academic Press, 1993.

SWINBURNE, T. R. Fatal yellows, bud rot and spear rot of African oil palm: a comparison of the symptoms of these diseases in Brazil, Ecuador and Columbia. **Planter**, v. 69, n. 802, p. 15-23, 1993.

TORRES, G. A.; SARRIA, G. A.; VARON, F.; COFFEY, M. D.; ELLIOTT, M. L.; MARTINEZ, G. First Report of Bud Rot Caused by *Phytophthora palmivora* on African Oil Palm in Colombia. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1163-, 2010.

TORRES, G. A.; SARRIA, G. A.; VARÓN, F.; MARTÍNEZ, G. Evidencias circunstanciales de la asociación de especies de la familia Tettigoniidae con el desarrollo de lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite. **Revista Palmas**, v. 29, n. 3, p. 53-61, 2008.

TREU, R. Macrofungi in oil palm plantations of South East Asia. **Mycologist**, v. 12, n. 1, p. 10-14, 1998.

TUPINAMBÁ, D. D.; CANTÃO, M. E.; COSTA, O. Y. A.; BERGMANN, J. C.; KRUGER, R. H.; KYAW, C. M.; QUIRINO, B. F. Archaeal Community Changes Associated with Cultivation of Amazon Forest Soil with Oil Palm. **Archaea: an International Microbiological Journal**, artigo 3762159, 2016.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990.

ZADOKS, J. C. **Comments on spear rot and fatal yellowing of oil palm**. AUDIT IRHO-visit to Latin America for CIRAD, 1990. 6 p. Relatório não publicado.

Informação Suplementar

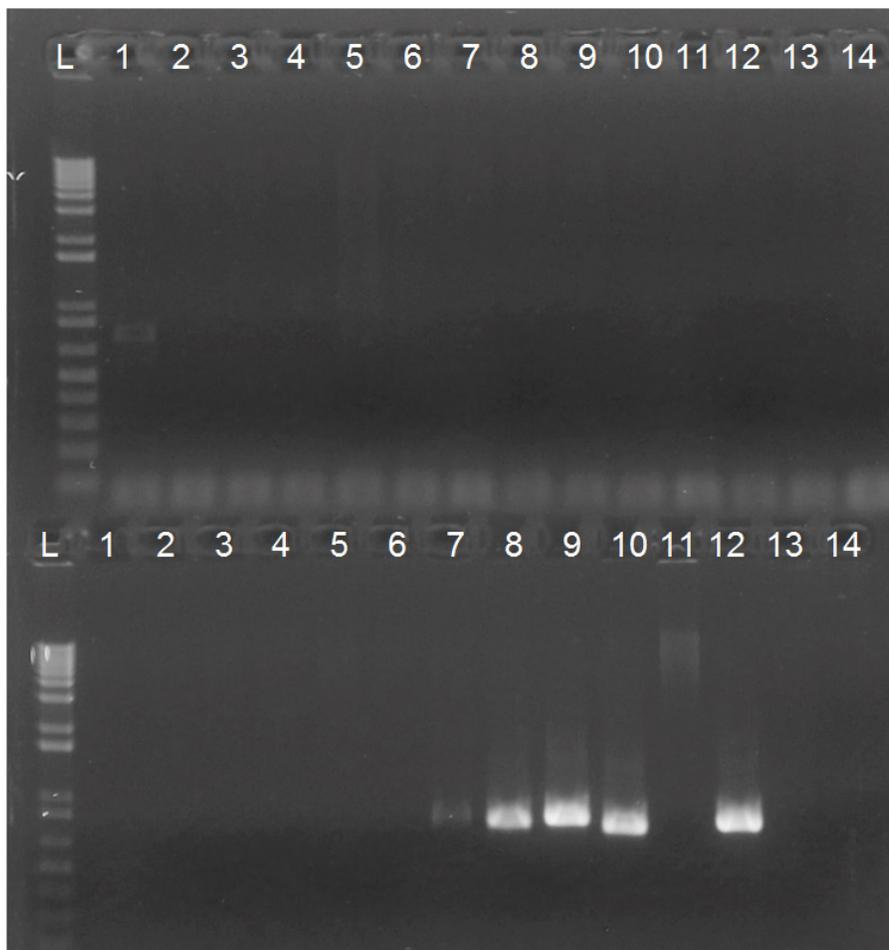


Figura S1. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Amplificação com o par de iniciadores A2/I2. **1ª linha.** L- Ladder 1 kb plus (Invitrogen). **1-SP 2.1; 2-SP 2.1 diluído 10X; 3-SP 2.2; 4-SP 2.2 diluído 10X; 5-SP 5.1; 6-SP 5.1 diluído 10X; 7-SP 5.2; 8-SP 5.2 diluído 10X; 9-SP 8.1; 10-SP 8.1 diluído 10X; 11-SP 8.2; 12-SP 8.2 diluído 10X; 13- AP 1; 14-AP 1 diluído 10X.** **2ª linha.** L- Ladder 1 kb plus (Invitrogen). **1-AP 2; 2-AP 2 diluído 10X; 3-AP 3; 4-AP 3 diluído 10X; 5-AP 4; 6-AP 4 diluído 10X; 7- DNA genômico de *Phytophthora* sp.; 8- DNA genômico de *Phytophthora capsicii*; 9- DNA genômico de *Phytophthora nicotianae*; 10- DNA genômico de *Phytophthora* sp.; 11- DNA genômico de *Escherichia coli*; 12- Controle positivo (DNA genômico de *Phytophthora nicotianae*); 13- Controle negativo (água); 14- Vazio.**

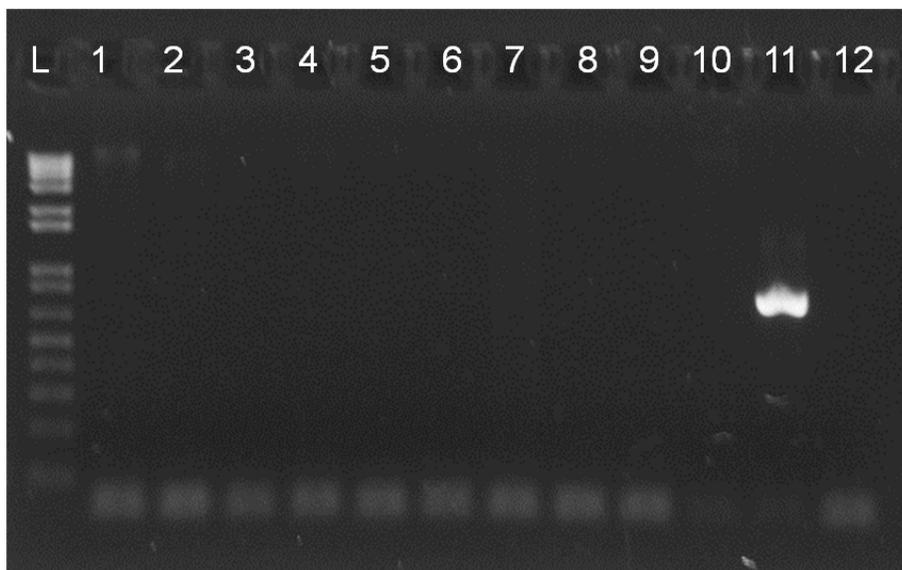


Figura S2. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Amplificação com o par de iniciadores A2/I2. L- Ladder 1 kb plus (Invitrogen). 1- Solo de planta assintomática diluído 5X; 2- Solo de planta assintomática diluído 15X; 3- Solo de planta assintomática diluído 100X; 4- Solo de planta sintomática estágio 5 diluído 5X; 5- Solo de planta sintomática estágio 5 diluído 15X; 6- Solo de planta sintomática estágio 5 diluído 100X; 7- Solo de planta sintomática estágio 8 diluído 5X; 8- Solo de planta sintomática estágio 8 diluído 15X; 9- Solo de planta sintomática estágio 8 diluído 100X; 10- Solo de Mata Nativa; 11- (DNA genômico de *Phytophthora nicotianae*); 12- Controle negativo (água) ; 13- Vazio; 14- Vazio.

Embrapa

Agroenergia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

GOVERNO
FEDERAL

CGPE 14688