

GUSTAVO HENRIQUE JERÔNIMO

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE  
BLASTOCLADIOMYCOTA E  
CHYTRIDIOMYCOTA DO PARQUE  
ESTADUAL DA ILHA DO CARDOSO (PEIC),  
CANANÉIA, ESTADO DE SÃO PAULO,  
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

São Paulo

2014

GUSTAVO HENRIQUE JERÔNIMO

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE  
BLASTOCLADIOMYCOTA E  
CHYTRIDIOMYCOTA DO PARQUE  
ESTADUAL DA ILHA DO CARDOSO (PEIC),  
CANANÉIA, ESTADO DE SÃO PAULO,  
BRASIL**

ORIENTADORA: DRA. CARMEN LIDIA AMORIM PIRES-ZOTTARELLI

São Paulo

2014

**Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Jerônimo, Gustavo Henrique  
J55a Avaliação da diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, estado de São Paulo, Brasil / Gustavo Henrique Jerônimo -- São Paulo, 2014  
180 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014  
Bibliografia.

1. Fungos zoospóricos. 2. Filogenia. 3. Mata Atlântica. I. Título

CDU: 582.281

“Morre nasce trigo, Vive morre pão”

Drão – Gilberto Gil

Dedico esta obra à minha esposa Carolina Jerônimo Alves

## Agradecimentos

Agradeço ...

Primeiramente à Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli pela orientação e amizade durante a condução deste estudo e pelo exemplo de força, dedicação e profissionalismo.

À minha esposa Carolina, pelo amor, amizade e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu pai Joaquim, minha avó Rosária e minha tia Luísa pelo amor e atenção dedicados.

À toda equipe do projeto “Diversidade de Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Hyphochytriomycota e Oomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil” em especial à Ana Lucia de Jesus, Agostina Virgínia Marano, José Ivanildo de Souza e Sarah Cristina Oliveira Rocha, pela agradável convivência e constante apoio e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido por meio de bolsa de mestrado através do Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB), sob coordenação da Dra. Marina Capelari.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio e suporte financeiro ao projeto “Diversidade de Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Hyphochytriomycota e Oomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil” (Processo FAPESP nº 12/50222-7).

Ao Instituto Florestal pela autorização concedida para as coletas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso e ao Instituto de Botânica de São Paulo pela infraestrutura oferecida e, em especial, à Pós-graduação e ao Núcleo de Pesquisa em Micologia.

Ao Juninho por nos conduzir e apresentar diversos locais no Núcleo Perequê.

Ao pesquisador e amigo Timothy James (Tim) pela ajuda com as etapas moleculares e pelo exemplo de humildade.

À todos os amigos, sem os quais esta caminhada não teria este desfecho e que mesmo distantes nunca serão esquecidos, Rafael Gandolfo (furmiga), André Cesário (CHUCK), Alexandre Ribeiro da Silva (DINO), Marcio (BLANKA) em especial aos meus grandes irmãos Alexei Zaratini, Thiago Vecchi, Artur Bez, Inajara Fiusa.

Aos meus amigos do alojamento, Aluísio, Michel, Stefano (Jean), Ana Livia, Priscila, Simone e Alan por dividir tantos momentos divertidos.

À todos os pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Micologia, José Ivanildo de Souza, Marina Capelari, Iracema Helena Schoenlein-Crusius, Rosely Ana Piccolo Grandi, Michel Navarro Benatti, Adriana de Mello Gugliotta, Vera Vitali, pelos ensinamentos e convivência prazerosa.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Micologia, Ricardo, Cecilia, Larissa, Jadson, Nelson, Fernanda e Ana Cristina, meu muito obrigado pelo convívio.

Ao pesquisador Edson Paulo Chu pelo auxílio na liofilização da biomassa fúngica.

Às pesquisadoras Noemia Ishizawa e Maria Aparecida de Jesus pela hospedagem e auxílio durante os testes da atividade antimicrobiana no INPA.

Aos meus cachorros Frida e Luigi.

## RESUMO

O Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), localizado no município de Cananéia, litoral Sul do Estado de São Paulo, constitui um importante fragmento preservado de Mata Atlântica, que representa uma amostra em escala reduzida da diversidade de fitofisionomias presentes na costa Atlântica do Brasil. Embora diversos estudos tenham sido realizados em áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, a diversidade dos fungos zoospóricos dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota nunca havia sido investigada no PEIC. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar e comparar a riqueza e a diversidade de representantes destes filos nos ecossistemas aquáticos e terrestres do parque. Para isto, de Agosto/2012 a Junho/2013, foram realizadas quatro coletas em corpos d'água doce e solo, em diferentes locais, a fim de se isolar o maior número de espécimes. Em laboratório, alíquotas destas amostras foram colocadas em placas de Petri e processadas mediante a técnica de iscagem múltipla. Para caracterização dos locais de coleta, foram mensurados o pH da água e do solo, o oxigênio dissolvido na água, a condutividade elétrica da água, a temperatura da água e do solo, bem como a umidade do solo. De um total de 256 isolamentos, 112 na água e 144 no solo, 34 táxons foram identificados, sendo todas primeiras citações para o PEIC. Dentre estes, *Chytriomycetes lucidus* Karling é citado pela primeira vez para o Brasil e *Entophlycis lobata* Willoughby & Towley e *Phlyctochytrium mucronatum* Canter para o Estado de São Paulo. Os valores dos índices de diversidade de Shannon ( $H'$ ), dominância de Simpson (D) e equitatividade (E), bem como o índice de similaridade de Sørensen, indicaram uma micota diversa, com poucos táxons dominantes, estando a maioria dos táxons presentes nas amostras de água e de solo. Os substratos celulósicos, utilizados como iscas, foram os que apresentaram maior diversidade, provavelmente reflexo da maior disponibilidade no

ambiente e/ou presença de mecanismos especializados para a degradação de compostos celulósicos. Oito táxons (*Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Cladochytrium replicatum* Karling, *C. tenue* Nowakowski, *Entophlyctis luteolus* Longcore, *Nowakowskiella multispora* Karling, *Polychytrium aggregatum* Ajello e *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf) foram obtidos em culturas puras, representando aproximadamente 24% do total de táxons identificados. As sequências gênicas destas espécies foram disponibilizadas no GenBank e análises filogenéticas preliminares para as regiões 18S, ITS e 28S do rDNA foram realizadas utilizando-se os métodos de Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana. *Cladochytrium tenue* e *N. multispora* foram incluídas pela primeira vez em análises filogenéticas. *C. tenue*, espécie tipo do gênero *Cladochytrium*, formalmente classificado entre os representantes da ordem Cladochytriales, apresentou altos valores de suporte com outros dois táxons do gênero *Cladochytrium* (*polystomum* e sp. NBRC) dentro da ordem Chytridiales. Esse posicionamento traz importantes implicações sobre a nomenclatura e morfologia do gênero *Cladochytrium* e conseqüentemente na família Cladochytriaceae e ordem Cladochytriales.

Palavras Chaves: biodiversidade, filogenia, fungos zoospóricos, Mata Atlântica.

## ABSTRACT

The “Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)”, located in the municipality of Cananéia, southern coast of São Paulo State, is an important fragment of preserved Atlantic Rainforest, which represents a small-scale sample of the diversity of vegetation types present on the Atlantic coast of Brazil. Although several studies have been conducted in the Atlantic Rainforest of São Paulo, the diversity of zoosporic fungi of the phyla Chytridiomycota and Blastocladiomycota had never been investigated in the PEIC. Therefore, this study aimed at analyzing and comparing the richness and diversity of representatives of these phyla in freshwater and terrestrial ecosystems of PEIC. For this purpose, from August/2012 to June/2013, four samplings of water and soil were conducted at different localities, in order to isolate the largest number of specimens. In the laboratory, aliquots of these samples were placed into Petri dishes and processed by the multiple baiting technique. For characterizing the sampling local, the pH of water and soil, dissolved oxygen in water, electrical conductivity in water, temperature in water and soil, as well as, soil moisture, were measured. A total of 256 isolates were recovered, 112 from water and 144 from soil. Thirty-four taxa were identified up to species level, which all are first recorded for the PEIC. *Chytrium lucidus* Karling is first cited for Brazil and *Entophlycis lobata* Willoughby & Towley and *Phlyctochytrium mucronatum* Canter for São Paulo State. The Shannon’s diversity (H'), Simpson’s dominance (D), evenness (E), and Sørensen’s similarity indices showed a diverse mycota with only a few dominant taxa, most of them common to both water and soil samples. The cellulosic substrates used as bait presented the greatest diversity, probably reflecting a high availability in the environment and/or the presence of specialized mechanisms for the degradation of cellulosic compounds. Eight taxa (*Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Cladochytrium replicatum* Karling, *C. tenue*

Nowakowski, *Entophlyctis luteolus* Longcore, *Nowakowskiella multispora* Karling, *Polychytrium aggregatum* Ajello and *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf) were obtained in pure culture, representing approximately 24% of the identified taxa. Sequences of these species were deposited in GenBank and preliminary phylogenetic analyzes of the 18S, 28S and ITS regions of the rDNA were performed by the Maximum Likelihood and Bayesian methods. *Cladochytrium tenue* and *N. multispora* were included for first time in phylogenetic analyzes. *C. tenue*, type specie of the genus *Cladochytrium* formally ranked among the representatives of the order Cladochytriales, showed high levels of support with two other taxa of the genus *Cladochytrium* (*polystomum* and sp. NBRC) within the order Chytridiales. This position has important implications on nomenclature and morphology of the genus *Cladochytrium* and consequently in order Cladochytriaceae family and Cladochytriales.

Key words – atlantic rainforest, biodiversity, phylogeny, zoosporic fungi.

## SUMÁRIO

<b>Introdução geral</b> .....	13
Objetivos específicos .....	16
Descrição da área de estudo.....	16
Referências bibliográficas .....	20
<b>Capítulo I - Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota em corpos de água doce do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo</b> .....	26
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados e discussão .....	37
Referências bibliográficas .....	89
<b>Capítulo II - Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota de solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo</b> .....	99
Introdução.....	102
Material e Métodos.....	104
Resultados e discussão .....	108
Referências bibliográficas .....	138
<b>Capítulo III - Análises moleculares e posicionamento filogenético de membros dos Filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Brasil: possíveis modificações nas ordens Chytridiales e Cladochytriales</b> .....	145
Introdução.....	148
Material e Métodos.....	150
Resultados e Discussão.....	154
Referências bibliográficas .....	171
<b>Considerações finais</b> .....	176
Referências bibliográficas .....	180

# Introdução geral

Os fungos classificados nos filós Blastocladiomycota e Chytridiomycota apresentam como similaridade a produção de esporos com um único flagelo liso, posteriormente inserido, e o posicionamento basal na árvore filogenética dentro do Reino Fungi (Hibbett *et al.* 2007). Chytridiomycota conta com 706 espécies distribuídas atualmente em oito ordens, Chytridiales, Cladochytriales, Lobulomycetales, Polychytriales, Rhizophlyctidales, Rhizophydiales, Spizellomycetales e Monoblepharidales (Sparrow 1942, Letcher *et al.* 2006, 2008, Kirk *et al.* 2008, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Simmons *et al.* 2009, Wakefield *et al.* 2010, Longcore & Simmons 2012), inseridas em duas classes, Chytridiomycetes e Monoblepharidomycetes. Já Blastocladiomycota, filo criado a partir de Blastocladiiales (ordem que anteriormente pertencia ao Filo Chytridiomycota), possui uma única classe, Blastocladiomycetes, e é composto por 179 espécies (Kirk *et al.* 2008), cujos representantes divergem do clado das quitrídias e são considerados grupo irmão juntamente com Zygomycota, Glomeromycota e *Olpidium* (James *et al.* 2006).

Representantes desses filós são considerados cosmopolitas, estando presentes nos diferentes ecossistemas aquáticos e terrestres, onde são frequentemente observados como sapróbios e/ou parasitas de algas, macrófitas, invertebrados, anfíbios, fungos e oomicetos (Shearer *et al.* 2007). Embora a maioria das espécies conhecidas seja decompositora de celulose, queratina e quitina (Powell 1993), algumas se destacam como causadoras de doenças em plantas de interesse econômico, como por exemplo, *Physoderma maydis* (Miyabe) Miyabe que causa mancha marrom do milho e *Synchytrium endobioticum* responsável pela verruga da batata (Alexopoulos *et al.* 1996). Espécies dos gêneros *Catenaria* Sorokin (*Catenaria spinosa* Martin, *Catenaria*

*anguillulae* Sorokin), *Coelomomyces* Keilin (*Coelomomyces utahensis* (Romney) Couch & Nielsen) e *Polycaryum* Stempell (*Polycaryum laeve* Stempell) são parasitas comuns em cladóceros, copépodos, rotíferos, nematóides e larvas de dípteros, atuando decisivamente no controle destas populações (Gleason *et al.* 2010). *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (1999) é considerado o principal responsável pelo declínio e extinção de mais de 200 espécies de anfíbios ao redor do mundo (Stuart *et al.* 2004), tendo recentemente sido descrita outra espécie no gênero, *Batrochochytrium salamandrivoras* (Martel 2013), parasita em populações de salamandras de fogo (*Salamandra salamandra* Linnaeus) na Holanda, apresentando rápidas taxas de infecção e provocando altos níveis de mortalidade.

Historicamente, a classificação de Blastocladiomycota e Chytridiomycota baseava-se nas características morfológicas, tais como, tipo de desenvolvimento do talo (monocêntrico ou policêntrico), presença ou ausência de opérculo, morfologia dos zoosporângios e presença e tipo de esporos de resistência (Sparrow 1960, Karling 1977, Barr 1980), tendo sido as duas primeiras as preponderantes para a classificação destes grupos basais (James *et al.* 2000). Foi a partir dos estudos de Barr (1981) que a classificação começou a ser reformulada, tendo em vista as características ultraestruturais dos zoósporos e, mais recentemente, por sequências de genes do DNA ribossomal (James *et al.* 2000, 2006, Letcher *et al.* 2008, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Longcore e Simmons 2012). Com isto, alguns organismos tradicionalmente classificados dentro do filo Chytridiomycota foram removidos, como por exemplo, o gênero *Rozella* Cornu, o qual está atualmente incluído em Cryptomycota, filo que se posiciona nas árvores filogenéticas no ponto onde os fungos e os animais divergiram; e o gênero *Olpidium* (Braun) Schröt considerado *incertae sedis*, embora as análises concatenadas das regiões RPB1, RPB2, Ef2 e actina *loci* o agrupe juntamente com

diferentes táxons tradicionalmente classificados dentro de Zygomycota, considerado grupo irmão de Blastocladiomycota. Estes dados filogenéticos indicam ainda que, dentre os fungos que produzem zoósporos, o gênero *Olpidium* é o mais próximo aos fungos terrestres, e que possivelmente no início do processo evolutivo, eles poderiam ter produzido zoósporos como mecanismo reprodutivo, característica perdida no decorrer da evolução (Sekimoto *et al.* 2011).

Apesar da expressiva frequência e importância destes fungos nos diversos ecossistemas, estudos com representantes dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota ainda são poucos no Brasil, especialmente se considerarmos a extensão e a riqueza em termos de diversidade de biomas existentes em nosso país. Este fato é especialmente devido ao pequeno número de especialistas no Brasil e a dificuldade de isolamento, identificação e cultivo desses grupos de fungos (Letcher & Powell 2005, Shearer *et al.* 2007). O bioma Mata Atlântica é, dentre os biomas brasileiros, o que agrupa o maior número de informações a respeito destes grupos de fungos (Beneke & Rogers 1962, 1970, Rogers *et al.* 1970, Lyra & Milanez 1974, Milanez *et al.* 1994, Pires-Zottarelli *et al.* 1996, Pires-Zottarelli 1999, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2010, entre outros), no entanto, para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) não existia ainda nenhum relato da ocorrência dos mesmos. Os únicos estudos realizados com a micota zoospórica no município de Cananéia são restritos a ecossistemas marinhos (sedimentos de mangue e solos de dunas), estando resumidos em apenas três artigos publicados na década de 70 (Ulken 1970, 1972, Booth 1979).

Considerando-se a situação de degradação das áreas de Mata Atlântica, exaustivamente citada em literatura, e a relevância desse bioma no Brasil e no Estado de São Paulo, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a riqueza e a diversidade

de Blastocladiomycota e Chytridiomycota presentes nos ecossistemas aquáticos e terrestres do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, de modo a ampliar o conhecimento destes grupos no país.

### **Objetivos específicos**

- Análise e comparação da riqueza e diversidade de táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota presentes na água (rios, riachos e cachoeiras) e no solo (próximo às margens dos corpos d'água) do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC);
- Cultivo das espécies identificadas em meios de cultura específicos;
- Inclusão das espécies no acervo do Instituto de Botânica (Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias – CCIBt e Herbário SP);
- Extração, amplificação e purificação do DNA ribossomal com subsequente sequenciamento das regiões 18S, ITS e 28S dos táxons cultivados.

### **Descrição da área de estudo**

O Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) (25°03'05''- 25°18'18''S; 47°53'48''-48°05'42''W), administrado pelo Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, abrange uma área de aproximadamente 22.500 ha, o qual está inserido no município de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo. O PEIC foi criado em 1962, com a intenção de preservar a biodiversidade e conter as ações e empreendimentos imobiliários iniciados na Ilha. Visava também, com a criação de um Parque Natural, a paralisação da exploração dos sambaquis, fauna e flora e em adição, estabelecer uma base de estudos da comissão de Pré-História e a implantação de um Instituto de Pesquisa (Secretaria do Meio Ambiente 2001). Segundo Beccato (2004), a

região tornou-se Parque Estadual em 1962 devido, principalmente, a sua riqueza em espécies, presentes nos diversos tipos de ecossistemas que compõem a Ilha.

De forma extraordinariamente irregular, com a porção norte muito larga, estreitando-se abrupta e acentuadamente em direção ao sul (Barros *et al.* 1991), a ilha é banhada a Leste pelo Oceano Atlântico, a Norte pelas águas da Baía de Trapandé, a Oeste pelo Canal do Ararapira e ao Sul pelas águas do mesmo canal que se prolonga até a Barra do Ararapira (Negreiros *et al.* 1974) (Figura 1).

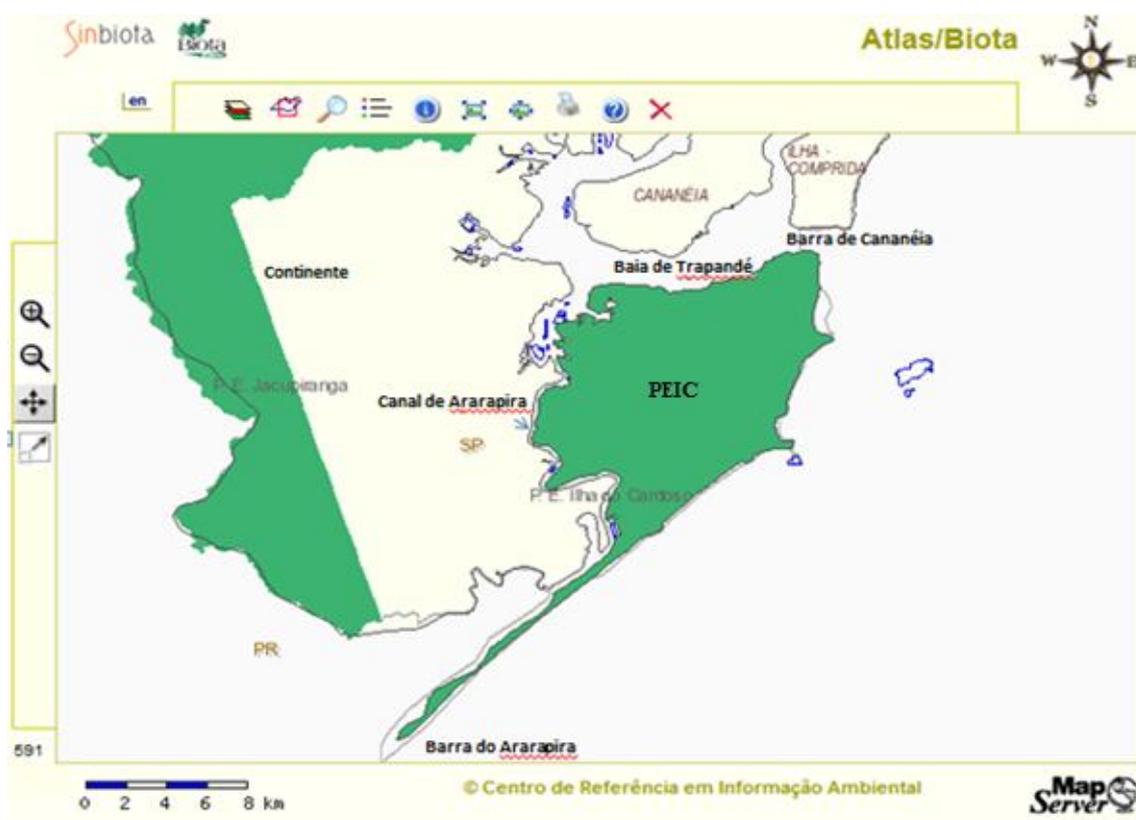


Figura 1: Mapa de localização do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo, SP. As regiões destacadas em verde correspondem a unidades de conservação administradas pelo Instituto Florestal (IF). Fonte: Biota Fapesp - (<http://sinbiota.biota.org.br/>)

A topografia da ilha é predominantemente montanhosa, sendo a região central formada por um maciço montanhoso contínuo com altitude máxima de 814 metros, cobertos por diferentes tipos de solos (Negreiros *et al.* 1974). O sistema de drenagem da Ilha é do tipo radial, com rios que desaguam diretamente no mar (Giulietti *et al.* 1983). O Rio Perequê é um rio de grande extensão que corta o PEIC, o qual passa por áreas de Floresta Pluvial Tropical da Serra do Mar e por Floresta Pluvial Tropical da Planície Litorânea, e é por meio destas que recebe numerosos afluentes (Barros *et al.* 1991). Segundo Pfeifer (1981) os cursos d'água são tipicamente tropicais, pois não alteram seus volumes anuais de escoamento com uma época de maior vazão que corresponde ao verão, e uma época de menor vazão entre os meses de julho e agosto. O autor afirma ainda que esta densa rede de drenagem é a responsável por transformar as regiões de baixada em um conjunto de restingas, canais e rios, pois não permite o seu completo assoreamento. Como consequência da sua topografia muitos desses cursos d'água apresentam-se encachoeirados. De acordo com Adams (2000), os corpos d'água existentes no PEIC, dependentes da alta pluviosidade, apresentam pH ácido e baixo conteúdo de nutrientes, pois estão associados ao substrato antigo e altamente lixiviado do Pré-Cambriano ou ao substrato do Pleistoceno-Holoceno das restingas.

O clima na Ilha é classificado como megatérmico superúmido, sem estação seca definida, com temperatura média anual de 21,2 °C, sendo os meses de janeiro, fevereiro e março os de maior pluviosidade, e junho, julho e agosto, os de menor precipitação (Ab'Saber 1977, Funari *et al.* 1987).

A vegetação existente do PEIC é extremante diversa, ocorrendo em sua extensão praticamente todas as formas de fisionomias vegetais características da faixa costeira de Mata Atlântica, como: 1) vegetação de mangue, 2) vegetação de restinga, 3) vegetação pioneira de dunas, 4) floresta tropical pluvial de planície litorânea e 5) floresta pluvial

da Serra do Mar (Barros *et al.* 1991). Em adição a essas formações, esses autores destacam também a formação arbustiva de topos e as decorrentes da ação do homem, que podem ser tratadas conjuntamente como “vegetação secundária” (Figura 2).

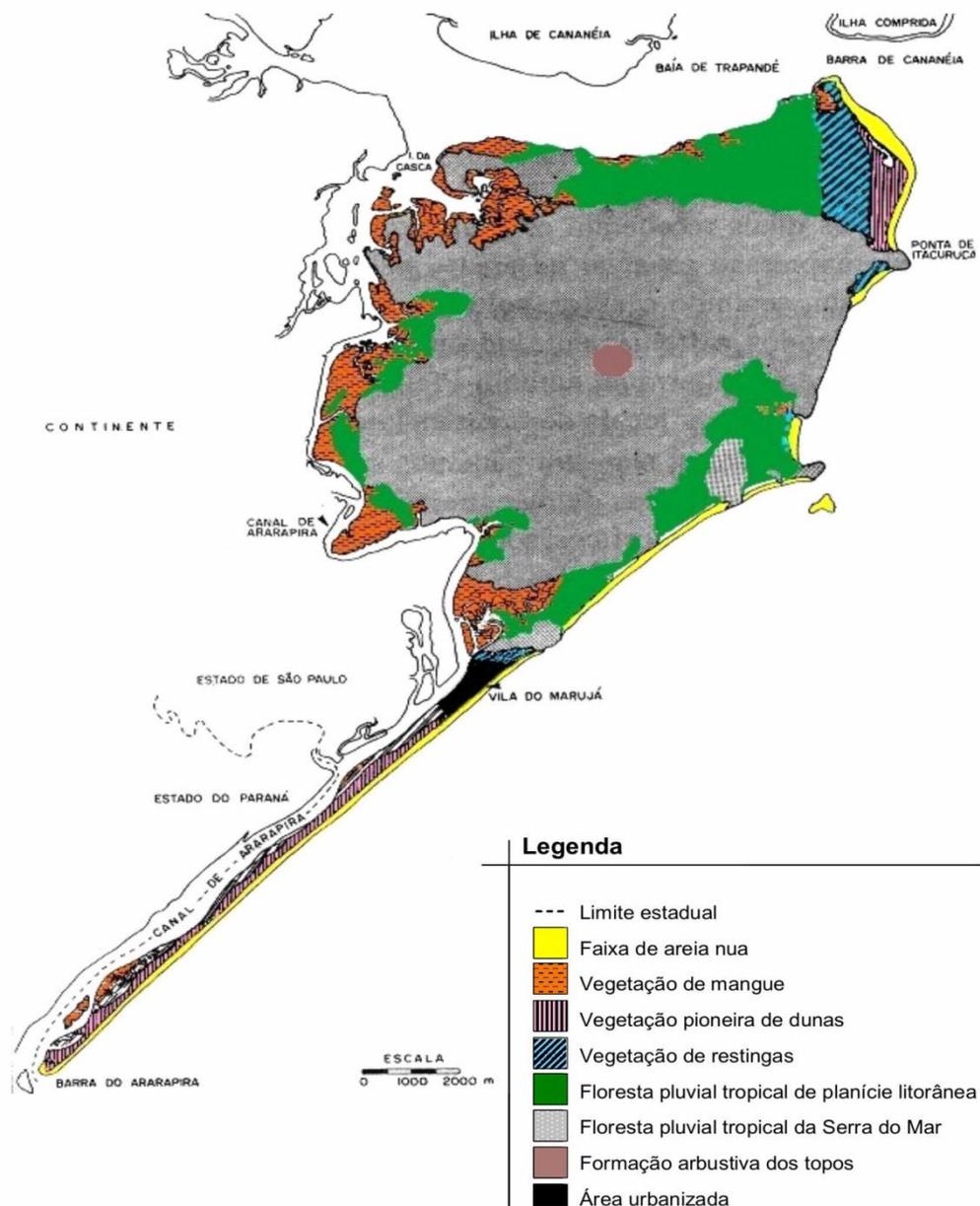


Figura 2: Diferentes tipos de formações vegetais existentes no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). Fonte: Romanini (2006).

O Núcleo Perequê, assim chamado em homenagem ao principal rio que corta este núcleo do PEIC, foi o escolhido para estudo por agregar diferentes formações vegetais, por ser um centro de pesquisas científicas, bem como, pela facilidade de acesso, tornando as coletas seguras e representativas no parque (Figura 3).

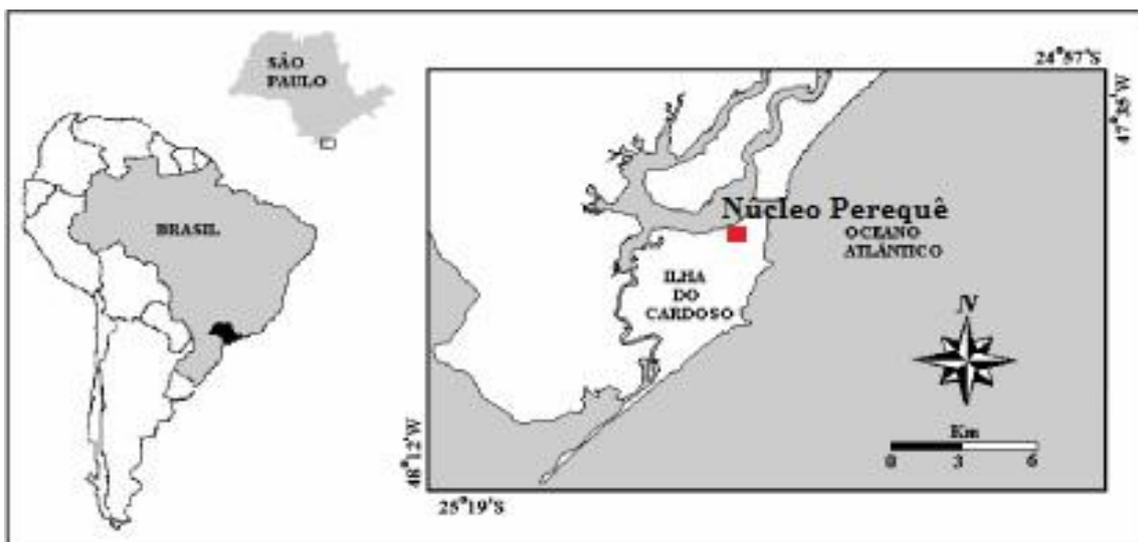


Figura 3: Mapa mostrando a localização do Núcleo Perequê, na porção Nordeste do PEIC. Fonte: Modificado de Gomes *et al.* (2007).

### Referências bibliográficas

- Ab'Saber, A.N.** 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. *Geomorfologia* 52: 1-21.
- Adams, C.** 2000. Caiçaras na Mata Atlântica: pesquisa científica versus planejamento e gestão ambiental. Annablume: FAPESP, São Paulo.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M.** 1996. *Introductory Mycology*. 4 ed. New York: John Wiley, Sons, Inc.
- Barr, D.J.S.** 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* 62: 1171-1201.

- Barr, D.J.S.** 1981. The phylogenetic and taxonomic implications of flagellar rootlet morphology among zoosporic fungi. *BioSystems* 14: 359-370.
- Barros, F., Melo, M.M.R.F., Chiea, S.A.C., Kirizawa, M. et al.** 1991. Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso. *Boletim do Instituto de Botânica*.
- Beccato, M.A.B.** 2004. Elaboração participativa de uma proposta de reestruturação do Sistema de Tratamento de Esgoto da Comunidade do Marujá – Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos.
- Beneke, E.S. & Rogers, L.** 1962. Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais. São Paulo and Paraná, Brazil. *Rickia* 1: 181-193.
- Beneke, E.S. & Rogers, A.L.** 1970. Aquatic fungi of Parque Nacional do Itatiaia in the State of Rio de Janeiro. *Rickia* 5: 51-64.
- Booth, T.** 1979. Strategies for study of fungi marine and marine influenced ecosystems. *Revista de Microbiologia* 10: 123-138.
- Funari F. L., Struffaldi-De-Vuono Y. & Salum S. T.** 1987. Balanço hídrico de duas áreas de Mata Atlântica: Reserva Biológica de Paranapiacaba e Parque Estadual da Ilha do Cardoso (Estado de São Paulo). *In: Anais do 6º Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo*, (Pereira M.F.A., Massei M.A.S. eds.). Sociedade Botânica de São Paulo, Campinas.
- Giulietti, A.M., Ribeiro Filho, E., Bueno, M.S.G. & Avelar, W.E.P.** 1983. Em busca do conhecimento ecológico: Uma introdução a metodologia. Editora Edgard Blücher, São Paulo.
- Gleason, F.H., Marano, A.V., Johnson, P. & Martin, W.W.** 2010. Blastocladian parasites of invertebrates. *Fungal Biology Reviews* 24: 56-67.

- Gomes, F.H., Vidal-Torrado, P., Macías, F., Gherardi, B. et al.** 2007. Solos sob vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I- Caracterização e classificação. Revista Brasileira de Ciência do solo 31: 1563-1580.
- Hibbett, D., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M. et al.** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 111: 509-547.
- James, T.Y., Porter, D., Leander, C.A., Vilgalys, R. et al.** 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. Canadian Journal of Botany 78: 1-15.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E. et al.** 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) description of a new phylum (Blastocladiomycota). Mycologia 98: 860-871.
- Karling, J. S.** 1977. Chytridiomycetorum Iconographia. Lubrecht & Cramer, Vaduz.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter D.W. & Stalpers, J.A.** 2008. Dictionary of fungi. 10<sup>a</sup> ed. CABI Publishing, United Kingdom.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2005. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). Nova Hedwigia 80: 115-133.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Churchill, P.F. & Chambers, J.G.** 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, of *Rhizophydiales* (Chytridiomycota). Mycological Research 110: 898-915.
- Letcher, P.M., Velez, C.G., Barrantes, M.E., Powell, M.J. et al.** 2008. Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. Mycological Research 112: 759-782.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K.** 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91: 219-227.

- Longcore, J.E. & Simmons, R.D.** 2012. The polychytriales ord. nov. contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. *Mycologia* 104: 276-294.
- Lyra, N.P. & Milanez, A.I.** 1974. Notas para o levantamento dos ficomicetos aquáticos do Estado de São Paulo. Recife, PE, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Publicação 698: 1-27.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs A., Blooi, M., Bert, W. et al.** 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. Causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National academic of Sciences of the United States of America (PNAS)* doi:10.1073/pnas.1307356110.
- Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Schoenlein-Crusius, I.H.** 1994. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 1. Monoblepharidales. *Hoehnea* 21:157-161.
- Mozley-Standridge, S.E., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Porter, D. et al.** 2009. Cladochytridiales- a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research*. 113: 498-507.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2009. Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23: 459-473.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2010. Blastocladiales e Spizellomycetales do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 693-704.
- Negreiros, O.C., Carvalho, C.T., Cesar, S.F., Duarte, F.R. et al.** 1974. Plano de Manejo para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Instituto Florestal. *Boletim Técnico* 9: 1-56.

- Pfeifer, R.M.** 1981. Levantamento semidetalhado dos solos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso. *Silvicultura em São Paulo* 15: 91-115.
- Pires-Zottarelli, C.L.A., Milanez, A.I., Schoenlein-Crusius, I.H. & Lohmann, L.G.** 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos Chytridiales*. *Hoehnea* 23: 77-90.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1999. Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, São Paulo, SP, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* 7: 309-329.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Rocha, M.** 2007. Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 21: 125-136.
- Powell, M.J.** 1993. Looking at mycology with a Janus face: a glimpse at Chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia* 85: 1 – 20.
- Rogers, A.L., Milanez, A.I. & Beneke, E.S.** 1970. Additional aquatic fungi from São Paulo State. *Rickia* 5: 93-110.
- Romanini, R.P.** 2006. Família Orchidaceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo.
- Secretaria do Meio Ambiente e Instituto Florestal.** 2001. Plano de manejo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP.
- Sekimoto, S., Rochon, D., Long, J.E., Dee, J.M. & Berbee, M.L.** 2011. A multigene phylogeny of *Olpidium* its implications for early fungal evolution. *BMC Evolutionary Biology* 11: 1-10.

- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J. et al.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation* 16: 49-67.
- Simmons, D.R., James, T.Y., Meyer, A.F. & Longcore, J.E.** 2009. Lobulomycetales, a new order in the Chytridiomycota. *Mycological Research* 113: 450-460.
- Sparrow, F.K.** 1942. A classification of aquatic Phycomycetes. *Mycologia* 34: 113-116.
- Sparrow, F.K.** 1960. *Aquatic Phycomycetes*. University of Michigan Press. 2<sup>a</sup> ed. Ann Arbor.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., et al.** 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783–1786.
- Ulken, A.** 1970. Phycomyceten aus der Mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven* 12: 313-319.
- Ulken, A.** 1972. Physiological studies on a Phycomycete from the Mangrove swamp at Cananéia, São Paulo, Brazil. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven* 13: 217-230.
- Wakefield, W.S., Powell, M.J., Letcher, P.M., Barr, D.J.S., Churchill, P.F. et al.** 2010. A molecular phylogenetic evaluation of the Spizellomycetales. *Mycologia* 102: 596-604.

# **Capítulo I**

## **Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota em corpos de água doce do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo**

**RESUMO** – (Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota em corpos de água doce do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, Estado de São Paulo). Para estudo da diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), situado em Cananéia, Estado de São Paulo, quatro amostragens de água doce foram realizadas em 15 locais, de Agosto/2012 a Junho/2013. Em laboratório, alíquotas das amostras foram transferidas para placas de Petri esterilizadas e os fungos zoospóricos iscados por meio da técnica de iscagem múltipla. Em 60 amostras, vinte e quatro táxons foram identificados, 23 deles são pertencentes ao filo Chytridiomycota e um ao Blastocladiomycota. Os valores dos índices de diversidade Shannon ( $H' = 2,70$ ), dominância de Simpson ( $D = 0,10$ ) e Equitatividade ( $E = 0,60$ ) são indicativos de uma micota bastante diversa e com poucos táxons dominantes. Todas as espécies identificadas são primeira citação para o PEIC. *Entophlycis lobata* Willoughby & Towley é citada pela primeira vez para o Estado de São Paulo.

Palavras-chave: biodiversidade, Mata Atlântica, fungos zoospóricos.

**ABSTRACT** – (Diversity of Blastocladiomycota and Chytridiomycota in freshwater of the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)”, Cananéia municipality, São Paulo State). To study the diversity of Blastocladiomycota and Chytridiomycota in the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)” located at Cananéia of municipality, São Paulo State, four sampling of freshwater samples were conducted at 15 sites, from August 2012 to June 2013. In the laboratory, aliquots of these samples were transferred to sterile petri dishes and the zoosporic fungi baited using the baiting technique. From 60 water samples collected were identified twenty-four taxa, 23 of them belonging to Chytridiomycota and one to Blastocladiomycota. The values of Shannon diversity ( $H' =$

2.70), Simpson dominance ( $D = 0.10$ ) and Evenness ( $E = 0.60$ ) are indicative of a diverse mycota with few taxa dominant. All species are the first record to the PEIC. *Entophlycis lobata* Willoughby & Towley is mentioned for the first time to São Paulo State.

Key words: Atlantic Rainforest, biodiversity, zoosporic fungi.

## Introdução

Os representantes dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota existem na Terra há pelo menos 400 milhões de anos como indicado por registros fósseis do baixo Devoniano (Taylor *et al.* 1992). São grupos de crucial importância para a evolução das demais formas de vida ao disponibilizar nutrientes para outros níveis tróficos da cadeia alimentar, por meio da decomposição de tecidos de algas, plantas e animais (Powell 1993) e pela liberação dos zoósporos que são prontamente consumidos pelo zooplâncton (Kagami *et al.* 2004).

Estes fungos estão distribuídos globalmente do ártico aos trópicos e podem ser encontrados em todos os tipos de habitats de água doce como cachoeiras, rios, riachos, lagos, lagoas, terrenos permanentemente ou temporariamente alagados, com poucas espécies em ambiente marinho (Sparrow 1960, Marano *et al.* 2011). Atuam como sapróbios ou parasitas de algas, plantas, invertebrados, outros fungos, oomicetos e anfíbios, podendo controlar estas populações, ou até mesmo acarretar grande declínio (Shearer *et al.* 2007).

Representantes desses filos produzem esporos flagelados (zoósporos) durante o processo de reprodução assexuada, flagelo este liso, posteriormente inserido (Alexopoulos *et al.* 1996). Chytridiomycota é considerado o grupo mais basal dentro do reino dos fungos (James *et al.* 2006), possuindo 706 espécies distribuídas atualmente em oito ordens, Chytridiales, Cladochytriales, Lobulomycetales, Polychytriales, Rhizophlyctidales, Rhizophydiales, Spizellomycetales e Monoblepharidales (Sparrow 1942, Letcher *et al.* 2006, 2008, Kirk *et al.* 2008, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Simmons *et al.* 2009, Wakefield *et al.* 2010, Longcore & Simmons 2012), inseridas em duas classes, Chytridiomycetes e Monoblepharidomycetes. Já Blastocladiomycota, filo criado a partir de Blastocladiiales (ordem que anteriormente pertencia ao Filo

Chytridiomycota), possui uma única classe e é composto por 179 espécies (Kirk *et al.* 2008), cujos representantes divergem do clado das quitrídias e são considerados grupo irmão juntamente com Zygomycota, Glomeromycota e *Olpidium* (James *et al.* 2006).

Apesar da importância desses filos, são ainda poucos os estudos realizados no Brasil, especialmente se considerarmos a extensão e a riqueza em termos de diversidade de ecossistemas existentes em nosso país. Este fato é especialmente devido ao pequeno número de especialistas no país e a dificuldade de isolamento, identificação e cultivo destes fungos. Letcher & Powell (2005) ressaltam a dificuldade de isolamento e manutenção da maioria dos isolados destes filos em meios de cultura, pois apresentam morfologia do talo muito simples e variável. De acordo com levantamento de todos os grupos de organismos zoospórios heterotróficos da América do Sul, elaborado por Steciow *et al.* (2012), são conhecidos no Brasil 18 táxons do Filo Blastocladiomycota e 121 de Chytridiomycota, sendo a maioria deles citados para regiões de Mata Atlântica, especialmente do Estado de São Paulo (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2013>) evidenciando, numericamente, a importância do Estado e dos pesquisadores nele existentes no reconhecimento taxonômico destes fungos para o país. No entanto, apesar de existirem muitos estudos que foram conduzidos em ecossistemas de água doce de áreas de Mata Atlântica (Beneke & Rogers 1962, 1970, Rogers *et al.* 1970, Pires-Zottarelli *et al.* 1996, Schoenlein-Crusius & Milanez 1998, Pires-Zottarelli 1999, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2010, entre outros), não existiam investigações no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). Para a região de Cananéia há apenas alguns estudos realizados na década de 70 (Ulken 1970, 1972, Booth 1979), entretanto, são restritos aos ambientes marinhos, ou regiões associadas, sendo de fundamental importância que as espécies presentes nos ambientes aquáticos sejam estudadas e documentadas, antes que os efeitos

antrópicos possam afetar a riqueza e a função das mesmas nos diferentes ecossistemas. É também imprescindível que culturas destes fungos sejam mantidas em coleções, de forma a permitir a conservação das espécies, bem como para futuras investigações filogenéticas, como ressaltado por Shearer *et al.*(2004). Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram analisar e comparar a riqueza e a diversidade dos fungos zoospóricos dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota em ambientes de água doce do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, importante fragmento de Mata Atlântica que contempla diversas formações vegetais.

## **Material e Métodos**

### **Descrição da área de estudo**

Situado na costa Sul do Estado de São Paulo, no município de Cananéia, entre os paralelos 25°03'05'' e 25°18'18''S e os meridianos 47°53'48'' e 48°05'42''W, o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) abrange uma área de 22.500 hectares, com distintas formações vegetais, que representam uma amostra em escala reduzida da diversidade de fitofisionomias presentes na Mata Atlântica do Brasil (Barros *et al.* 1991). A região central do PEIC atinge cerca de 800 metros de altitude devido à presença de um maciço montanhoso, coberto nas porções alta e média por Floresta Pluvial da Serra do Mar e Formação Arbustiva de Topos, ocorrendo nas regiões mais baixas as Florestas Pluviais da Planície Litorânea, Restingas, Vegetação Pioneira de Dunas e Manguezais. O clima da região, segundo classificação de Köppen, se enquadra como Cfa, mesotérmico úmido, sem estação seca definida, com temperatura média anual de 21,2 °C, sendo os meses de janeiro, fevereiro e março os de maior pluviosidade, e junho, julho e agosto, os de menor precipitação (Ab'Saber 1977, Funari *et al.* 1987). A presença de um maciço

montanhoso central, a grande quantidade de chuvas e os variados tipos de vegetação, possibilitam a formação de diferentes e numerosos corpos de água doces (Barros *et al.* 1991).

### **Metodologia de coleta, iscagem, isolamento, purificação, identificação e preservação dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota**

Foram realizadas quatro coletas (Agosto e Novembro de 2012 e Fevereiro e Junho de 2013), no Núcleo Perequê, localizado na porção nordeste do PEIC, área cortada por inúmeros corpos d' água doce que permeiam diferentes tipos de formações vegetais existentes na ilha. Destes, quinze foram amostrados (Figuras 1-16), os quais são formados pelo Rio Perequê e seus afluentes. Em campo, foram mensuradas algumas variáveis abióticas, como temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH, oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e condutividade elétrica ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ) com auxílio dos aparelhos U-10/U-51 Horiba, de forma a caracterizar a água dos locais amostrados. Em laboratório, alíquotas das amostras (30 ml) foram colocadas em placas-de-Petri, juntamente com substratos de origem animal e vegetal coletados nos locais amostrados, e submetidas à técnica de iscagem múltipla descrita em Milanez (1989), que consiste na adição de substratos celulósicos (celofane, epiderme de cebola, palha de milho e sementes de *Sorghum*), queratinosos (ecdise de cobra e cabelo loiro de criança) e quitinoso (exoesqueleto de camarão), bem como, grãos de pólen de *Pinus* sp. Com exceção dos grãos de pólen e cabelo loiro de criança, as demais iscas foram padronizadas em fragmentos de 1 cm de diâmetro, sendo colocados dois de cada nas amostras. Estas amostras foram mantidas em laboratório, temperatura controlada em aproximadamente  $21^{\circ}\text{C}$ , e após uma semana as iscas foram observadas e os espécimes de fungos zoospóricos isolados em novas iscas e/ou meios de culturas específicos (PmTG – 0,4 g/L de leite peptonizado, 0,4 g/L de triptona e 10 g/L de ágar e mPmTG - 0,2 g/L de leite peptonizado, 0,2 g/L de triptona e 10 g/L de ágar), com adição de 200mg/L de sulfato de estreptomicina e penicilina G (Longcore 1995).

Os espécimes isolados foram identificados com auxílio dos trabalhos monográficos de Sparrow (1960) e Karling (1977), bem como, das descrições originais e preservados em tubos com meio de cultura (PmTG), sendo então incorporados na Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt). Para os que não cresceram nos meios de culturas testados, foram preparadas lâminas semipermanentes com lactofenol e azul de algodão, as quais foram incorporadas ao Herbário do Instituto de Botânica (SP). Todas as espécies identificadas foram documentadas por meio de fotografias realizadas em equipamento de captura de imagem Leica Qwin V3, para disponibilização das mesmas em diferentes mídias.

A frequência (%) dos táxons identificados foi calculada mediante a contagem dos números de unidades amostrais colonizadas pelo táxon/número de unidades amostrais examinadas x 100, onde cada local de coleta foi considerado uma unidade amostral (Jesus *et al.* 2013). Para determinação da frequência mensal o mesmo cálculo foi efetuado, no entanto, cada mês de coleta foi considerado como uma unidade amostral. A abundância dos espécimes foi calculada com base na presença ou ausência de determinado táxon em cada tipo de isca/número total de iscas examinadas x 100 (Zak & Willig 2004). A estrutura da comunidade foi calculada por meio da (i) riqueza de espécies ( $S$ ); (ii) índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ) =  $-\sum_{i=1}^S pi \cdot \log_n(pi)$ , onde  $pi$  é a proporção de espécies na comunidade; (iii) equitatividade ( $E$ ) =  $H'/H'_{\max}$ , onde  $H'_{\max}$  é o máximo valor da diversidade do número de táxons presentes; (iv) índice de dominância de Simpson ( $D$ ) =  $1 - \sum_{i=1}^S (pi)^2$  calculado com base na abundância (Zak & Willig 2004).



Figuras 1-6. Corpos d'água doce amostrados no PEIC. A1. Cachoeira do Perequê (corredeira). A2. Cachoeira do Perequê (remanso). A3. Afluente do Rio Perequê. A4. Poço das Antas (parte superior). A5. Poço das Antas (corredeira). A6. Poço das Antas (parte inferior).



Figuras 7-12. Corpos d'água doce amostrados no PEIC. A7. Rio Perequê (remanso). A8. Rio Perequê (parte inferior). A9-A10. Poças na trilha Transcardoso. A11. Riacho (sem nome) localizado atrás da comunidade residente no Nucleo Perequê. A12. Riacho (sem nome) localizado próximo a comunidade residente no Núcleo Perequê.



Figuras 13-16. Corpos d'água doce amostrados no PEIC. A13. Riacho (sem nome) localizado ao lado dos palmeiros próximo à comunidade residente do Núcleo Perequê. A14. Riacho (sem nome) localizado próximo à comunidade residente do Núcleo Perequê. A15-16. Riacho (sem nome) localizado próximo à base de pesquisas do Núcleo Perequê.

A distribuição geográfica das espécies baseou-se em literatura (Milanez *et al.* 2007), complementada com trabalhos mais recentes. O sistema utilizado para a classificação dos táxons identificados foi o contido em Kirk *et al.* (2008), atualizado com os trabalhos de proposição da ordem Cladochytriales (Mozley-Standrigde *et al.* 2009) por apresentar dados moleculares, ultraestruturais e nomenclaturais consistentes.

## **Resultados e discussão**

### **Caracterização abiótica da água dos locais amostrados**

Foi observada grande heterogeneidade com relação aos fatores abióticos mensurados na água nos meses e locais amostrados (Tabela 1). A maioria dos locais de coleta apresentou baixos valores de condutividade elétrica; no entanto, quatro locais (A11, A12, A13 e A14) apresentaram valores médios de condutividade elétrica mais elevados e baixos teores de oxigênio dissolvido. A12 e A13 possuem águas de coloração marrom-escura, reflexo da entrada de material vegetal e substâncias húmicas do solo. Já A11 e A14 localizam-se muito próximos à comunidade residente no Núcleo Perequê, e os resultados obtidos podem apontar alguma influência indireta da comunidade, provavelmente devido à entrada de matéria orgânica nestes corpos d'água. Entretanto, os locais se mostraram geralmente bem oxigenados, com teores mais altos na Cachoeira (A2), e mais baixos em corpos d'água localizados mais próximos à comunidade do Perequê (A11 a A15). A temperatura da água apresentou flutuações conforme a estação do ano, mais elevada nas coletas realizadas em épocas mais quentes (novembro/2012 e fevereiro/2013), e mais baixa nos meses mais frios (agosto/2012 e junho/2013). O pH da água variou de ácido a neutro, com prevalência de pH ácido, com menor valor médio de 4,2 no A13.

Tabela 1. Fatores abióticos mensurados na água dos locais amostrados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP. sd\* = sem dados devido aos problemas apresentados pelo sensor de oxigênio do equipamento U-10 Horiba. DP = desvio padrão.

Fator abiótico	pH				Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )					Oxigênio dissolvido ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )					Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )					
	Locais de coleta/meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	Média $\pm$ DP	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	Média $\pm$ DP	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	Média $\pm$ DP	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13
A1	5,6	7	5,7	5,8	<b>6,0 <math>\pm</math> 0,7</b>	0,047	0,051	0,051	0,065	<b>0,054 <math>\pm</math> 0,008</b>	8,4	7,9	9,7	8,5	<b>8,6 <math>\pm</math> 0,8</b>	18	21	23	19	<b>20 <math>\pm</math> 2</b>
A2	5,7	6,6	6,1	5,9	<b>6,1 <math>\pm</math> 0,4</b>	0,039	0,043	0,043	0,046	<b>0,043 <math>\pm</math> 0,003</b>	8,3	7,5	10,4	9,2	<b>8,9 <math>\pm</math> 1,2</b>	18	21	23	19	<b>20 <math>\pm</math> 2</b>
A3	5,3	5,5	5,8	5,6	<b>5,6 <math>\pm</math> 0,2</b>	0,042	0,057	0,052	0,049	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,006</b>	6,4	3,3	6,5	7,3	<b>5,9 <math>\pm</math> 1,8</b>	18	22	24	18	<b>21 <math>\pm</math> 3</b>
A4	6,3	5,9	6,3	5,8	<b>6,1 <math>\pm</math> 0,3</b>	0,049	0,053	0,05	0,081	<b>0,058 <math>\pm</math> 0,015</b>	8,8	7	10,4	8,8	<b>8,8 <math>\pm</math> 1,4</b>	18	22	24	19	<b>21 <math>\pm</math> 3</b>
A5	6,3	5,8	6,5	6,3	<b>6,2 <math>\pm</math> 0,3</b>	0,049	0,052	0,034	0,051	<b>0,047 <math>\pm</math> 0,008</b>	8,5	sd*	9,3	8,9		18	22	24	19	<b>21 <math>\pm</math> 3</b>
A6	5,7	5,2	6,5	6,4	<b>6,0 <math>\pm</math> 0,6</b>	0,049	0,054	0,05	0,051	<b>0,051 <math>\pm</math> 0,002</b>	7,4	sd*	10,6	8,3		18	22	23	19	<b>21 <math>\pm</math> 2</b>
A7	6,4	5,2	6,4	6,3	<b>6,1 <math>\pm</math> 0,6</b>	0,049	0,053	0,049	0,049	<b>0,050 <math>\pm</math> 0,002</b>	4,7	sd*	8,9	7,7		19	22	23	19	<b>21 <math>\pm</math> 2</b>
A8	6,4	5,4	6,4	6,4	<b>6,2 <math>\pm</math> 0,5</b>	0,047	0,046	0,049	0,049	<b>0,048 <math>\pm</math> 0,002</b>	7,1	sd*	8,4	9,7		18	22	24	19	<b>21 <math>\pm</math> 3</b>
A9	4,9	5,4	4,4	4,5	<b>4,8 <math>\pm</math> 0,5</b>	0,08	0,063	0,046	0,053	<b>0,061 <math>\pm</math> 0,015</b>	6,6	sd*	4,9	7		23	24	25	19	<b>23 <math>\pm</math> 3</b>
A10	6,2	4,3	4,9	5,9	<b>5,3 <math>\pm</math> 0,9</b>	0,042	0,041	0,035	0,04	<b>0,040 <math>\pm</math> 0,003</b>	7,4	2,4	5,9	9,7	<b>6,4 <math>\pm</math> 3,1</b>	22	23	25	20	<b>23 <math>\pm</math> 2</b>
A11	6,7	6,1	5,6	5,9	<b>6,1 <math>\pm</math> 0,5</b>	0,564	0,423	0,068	0,075	<b>0,283 <math>\pm</math> 0,250</b>	2,3	2,9	4,9	5,7	<b>4,0 <math>\pm</math> 1,6</b>	20	22	24	20	<b>22 <math>\pm</math> 2</b>
A12	4,4	5,5	3,8	4	<b>4,4 <math>\pm</math> 0,8</b>	0,056	1,22	0,394	0,096	<b>0,442 <math>\pm</math> 0,540</b>	2,5	sd*	5,9	2,4		19	23	24	20	<b>22 <math>\pm</math> 2</b>
A13	4,5	4,6	3,8	4	<b>4,2 <math>\pm</math> 0,4</b>	0,056	0,067	0,31	0,094	<b>0,132 <math>\pm</math> 0,120</b>	2,4	sd*	9,3	3,3		19	23	24	20	<b>22 <math>\pm</math> 2</b>

Fator abiótico	pH					Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )					Oxigênio dissolvido ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )					Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )				
	Locais de coleta/meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	Média $\pm$ DP	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	Média $\pm$ DP	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	Média $\pm$ DP	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13
A14	5,7	5,6	4,9	4,8	<b>5,3 <math>\pm</math> 0,5</b>	0,198	0,202	0,081	0,06	<b>0,135 <math>\pm</math> 0,075</b>	2,4	sd*	4,3	8,7		19	25	24	18	<b>22 <math>\pm</math> 4</b>
A15	5,9	5,1	5,9	6	<b>5,7 <math>\pm</math> 0,4</b>	0,045	0,06	0,081	0,053	<b>0,060 <math>\pm</math> 0,015</b>	3,4	3,3	9,5	4	<b>5,1 <math>\pm</math> 3,0</b>	20	23	25	21	<b>22 <math>\pm</math> 2</b>

### Ocorrência e distribuição dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota identificados no período de estudo

Foram identificados 24 táxons, 22 em nível específico, das 60 amostras analisadas, com 112 ocorrências (Tabela 2). Os valores dos índices de diversidade de Shannon ( $H' = 2,3$ ), dominância de Simpson ( $D = 0,1$ ) e equitatividade ( $E = 0,8$ ), indicam uma comunidade diversa com poucos táxons dominantes, similar aos resultados de Marano *et al.* (2008) para ecossistemas aquáticos da Argentina e de Nascimento *et al.* (2011) para áreas de Cerrado do Estado de São Paulo.

Os táxons identificados estão distribuídos nos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota, agrupados neste estudo dentro de três classes (Blastocladiomycetes, Chytridiomycetes e Monoblepharidomycetes) e cinco ordens (Blastocladales, Chytridiales, Cladochytriales, Rhizophydiales e Monoblepharidales), com maior representatividade do Filo Chytridiomycota (96%). Chytridiales foi a ordem mais representada, com 14 táxons (58%) e Chytridiaceae a família com o maior número de espécies, 33% do total (Tabela 2).

A maioria dos táxons identificados é considerada cosmopolita e já foi anteriormente relatada no país (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Rocha, 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012); no entanto, todos são primeiros registros para o PEIC. *Entophlyctis lobata* é citado pela primeira vez para o Estado de São Paulo. Dentre os táxons identificados, seis deles, *Chytrium appendiculatus*, *C. spinosus*, *Cladochytrium replicatum*, *C. tenue*, *Nowakowskiella multispora* e *Polychytrium aggregatum* ocorreram durante todo o período amostrado (100% de frequência). Rocha (2004), Nascimento & Pires-Zottarelli (2009) e Nascimento *et al.* (2011) também relataram a predominância de *C. appendiculatus* e *C. replicatum* em ecossistemas aquáticos; no entanto, a baixa

frequência de *C. spinosus* relatado por Nascimento & Pires-Zottarelli (2009) não ocorreu no PEIC, tendo sido esta espécie a segunda mais frequente. Como também relatado por Marano *et al.* (2008) e Nascimento *et al.* (2011), a maioria dos táxons em ecossistemas aquáticos apresentaram baixos valores de frequência de ocorrência, como foi observado para *Catenochytridium* sp., *Diplophlyctis asteroidea*, *D. complicata*, *Entophlyctis luteolus*, *E. lobata*, *Gonapodya prolifera*, *Karlingiomyces granulatus*, *Karlingiomyces* sp., *Phlyctochytrium aureliae*, *P. furcatum*, *Rhizophyidium coronum* e *R. elyense*, os quais foram encontrados somente em uma das coletas (25% de frequência). A presença de *Gonapodya prolifera* dentre as espécies menos frequentes, também foi relatada por Nascimento *et al.* (2011) para os Córregos do Cortado e Capitinguinha no Cerrado da Reserva Biológica de Mogi Guaçu. Dentre as espécies mais frequentes, *Chytrium spinosus* e *Cladochytrium replicatum* apresentaram os maiores valores de abundância (2,22% e 2,64%, respectivamente). O mês de novembro de 2012 apresentou maior número de táxons e ocorrências, com 17 táxons identificados e 36 ocorrências dos mesmos. Sete (41%) destes 17 táxons identificados ocorreram exclusivamente em novembro, entre eles, *Phlyctochytrium furcatum*, *Diplophlyctis asteroidea*, *Karlingiomyces* sp., *K. granulatus*, *Catenochytrium* sp., *Rhizophyidium coronum* e *R. elyense* (Tabela 2).

Tabela 2. Blastocladiomycota e Chytridiomycota de amostras de água doce do Parque Estadual da Ilha do Cardoso nos diferentes meses de coleta. \* Primeira citação para o Estado de São Paulo. F(%) = frequência e A (%) = abundância.

Táxons /meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	F (%)	A (%)	Total
REINO FUNGI							
FILO BLASTOCLADIOMYCOTA							
BLASTOCLADIOMYCETES							
BLASTOCLADIALES							
CATENARIACEAE							
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling	3	2	1	0	75	0,83	
FILO CHYTRIDIOMYCOTA							
CHYTRIDIOMYCETES							
CHYTRIDIALES							
CHYTRIDIACEAE							
<i>Chytrium appendiculatus</i> Karling	4	2	4	1	100	1,53	
<i>C. hyalinus</i> Karling	2	1	0	0	50	0,42	
<i>C. spinosus</i> Fay	6	2	4	4	100	2,22	
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello	1	0	0	0	25	0,14	
<i>P. furcatum</i> Sparrow	0	1	0	0	25	0,14	
<i>Karlingiomyces dubius</i> (Karling) Sparrow	0	0	1	1	50	0,28	
<i>K. granulatus</i> (Karling) Sparrow	0	1	0	0	25	0,14	
<i>Karlingiomyces</i> sp.	0	2	0	0	25	0,28	
ENDOCHYTRIAACEAE							
<i>Entophlyctis luteolus</i> Longcore	2	0	0	0	25	0,28	
<i>E. lobata</i> Willoughby & Towley*	0	0	0	1	25	0,14	
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma	0	2	0	0	25	0,28	
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma	1	0	0	0	25	0,14	
<i>D. intestina</i> (Schenk) Schröter	0	3	0	1	50	0,56	
<i>D. sarcoptoides</i> (H.E. Petersen) Dogma	1	0	0	1	50	0,28	
CLADOCHYTRIALES							
CLADOCHYTRIAACEAE							
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	6	7	3	3	100	2,64	
<i>C. tenue</i> Nowakowski	3	2	4	2	100	1,53	
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello	1	2	5	2	100	1,39	
INCERTAE SEDIS							
<i>Catenochytridium</i> sp.	0	1	0	0	25	0,14	
NOWAKOWSKIACEAE							
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i> Shanor	0	2	1	2	75	0,69	
<i>N. multispora</i> Karling	2	4	2	1	100	1,25	
RHIZOPHYDIALES							
RHIZOPHYDIACEAE							

Táxons /meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	F (%)	A (%)	Total
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson	0	1	0	0	25	0,14	
<i>R. elyense</i> Sparrow	0	1	0	0	25	0,14	
MONOBLEPHARIDOMYCETES							
MONOBLEPHARIDALES							
GONAPODYACEAE							
<i>Gonapodya prolifera</i> (Cornu) Fischer	0	0	0	1	25	0,14	
<b>Total de táxons</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>11</b>			
<b>Total de ocorrências</b>	<b>32</b>	<b>36</b>	<b>25</b>	<b>19</b>			<b>112</b>

## REINO FUNGI

### FILO BLASTOCLADIOMYCOTA

#### BLASTOCLADIOMYCETES

#### BLASTOCLADIALES

#### CATENARIACEAE

*Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling, American Journal of Botany 52: 134. 1965.

Basiônimo: *Phlyctorhiza variabilis* Karling, American Journal of Botany 34: 27. 1947.

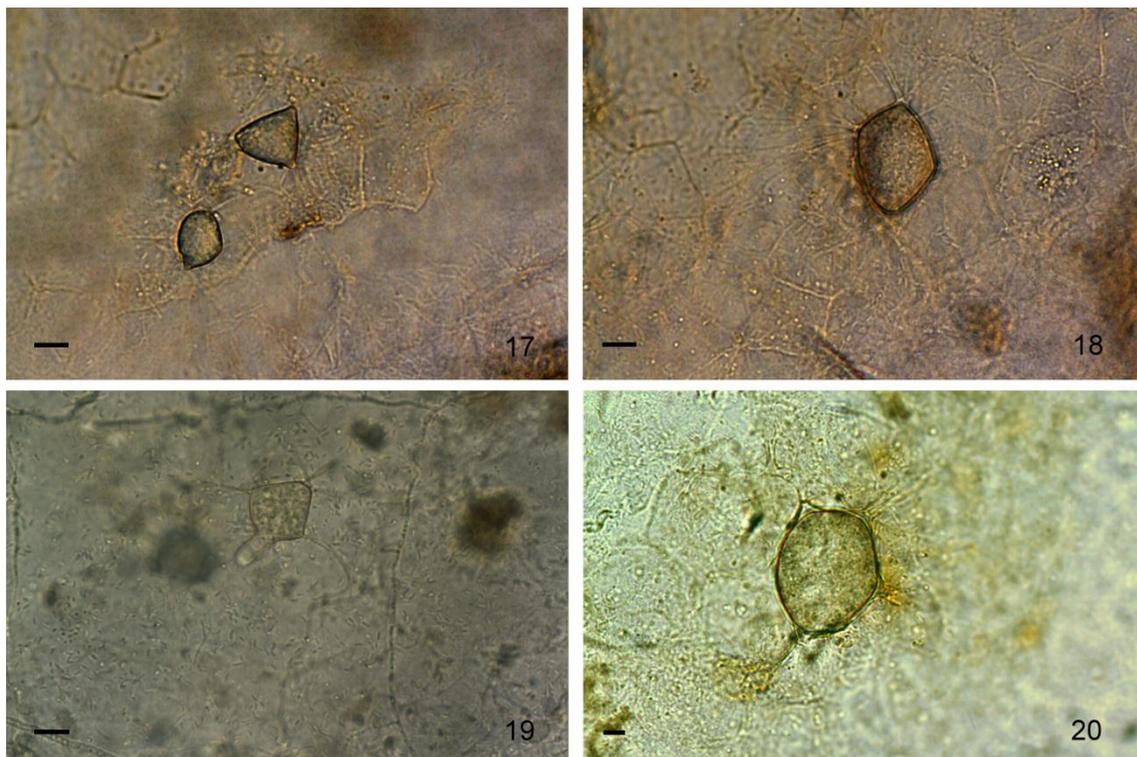
Figuras 17-20

Talo eucárpico, monocêntrico ou policêntrico, intramatricial. Sistema rizoidal surgindo a partir de vários pontos do zoosporângio. Zoosporângios lisos, irregulares, elípticos, 22-30 x 28-32 µm, e ovais, 25-40 x 31-32 µm. Liberação dos zoósporos e produção de esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de água, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 7-VII-2012, 26-II-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445991).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2010, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: Karling (1946) inicialmente nomeou essa espécie como *Perirhiza endogena*, mas nesta ocasião nenhuma diagnose foi feita pelo autor. Pouco depois, Hanson (1946) estabeleceu o gênero *Phlyctorhiza* e a espécie *Phlyctorhiza endogena*, a qual foi transferida para *Phlyctorhiza variabilis* por Karling (1947a), a partir de então, validamente publicada. Karling (1947a) descreveu *P. variabilis* como eucárpica, monocêntrica, a qual poderia ocasionalmente desenvolver talos policêntricos. Esta característica foi posteriormente rejeitada pelo próprio autor (Karling, 1951), que observou que a produção de talos policêntricos também era bastante significativa, e que naturalmente ocorria a formação de cepas monocêntricas e policêntricas, mas a abundante produção de talos policêntricos, similares aos que ocorriam no gênero *Catenaria*, o fez questionar a classificação de *P. variabilis*, classificado na família Catenariaceae dentro da ordem Blastocladiales. Rothwell (1956) em um estudo fisiológico mostrou que esta espécie crescia bem em uma variedade de meios sintéticos e por isso não podia ser tratada como estritamente queratinofílica. Karling (1965) propôs então uma nova combinação, e assim o gênero *Phlyctorhiza* estabelecido por Hanson (1946), foi renomeado para *Catenophlyctis* e a espécie *Catenophlyctis variabilis* estabelecida. De acordo com Karling (1965), a presença de um rizomicélio extremamente fino e longo, pode causar confusão sobre o monocentrismo ou policentrismo do talo, pois geralmente somente os rizóides próximos aos zoosporângios podem ser visualizados, característica observada nos isolados do PEIC, o que concorda com os espécimes descritos por Karling (1965) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2010, 2012). A liberação dos zoósporos e a produção de esporos de resistência não foi observada, concordando com Rocha & Pires-Zottarelli (2002), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2010, 2012) para os isolados brasileiros.



Figuras 17-20. *Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling. 17. Talo policêntrico. 18. Zoosporângio irregular. 19. Tubo de liberação dos zoósporos. 20. Zoosporângio ovalado. Barras = 10  $\mu$ m.

## FILO CHYTRIDIOMYCOTA

### CHYTRIDIOMYCETES

#### CHYTRIDIALES

#### CHYTRIDIACEAE

*Chytriomycetes appendiculatus* Karling, Bulletin of the Torrey Botanical Club 74: 335. 1947.

Figuras 21-26

Talo monocêntrico, eucárpico, extra-intramatrical. Zoosporângios não apofisados, operculados, apendiculados, lisos, hialinos quando jovens, tornando-se marrom-amarelados e com parede espessa com a idade, variáveis em forma e tamanho,

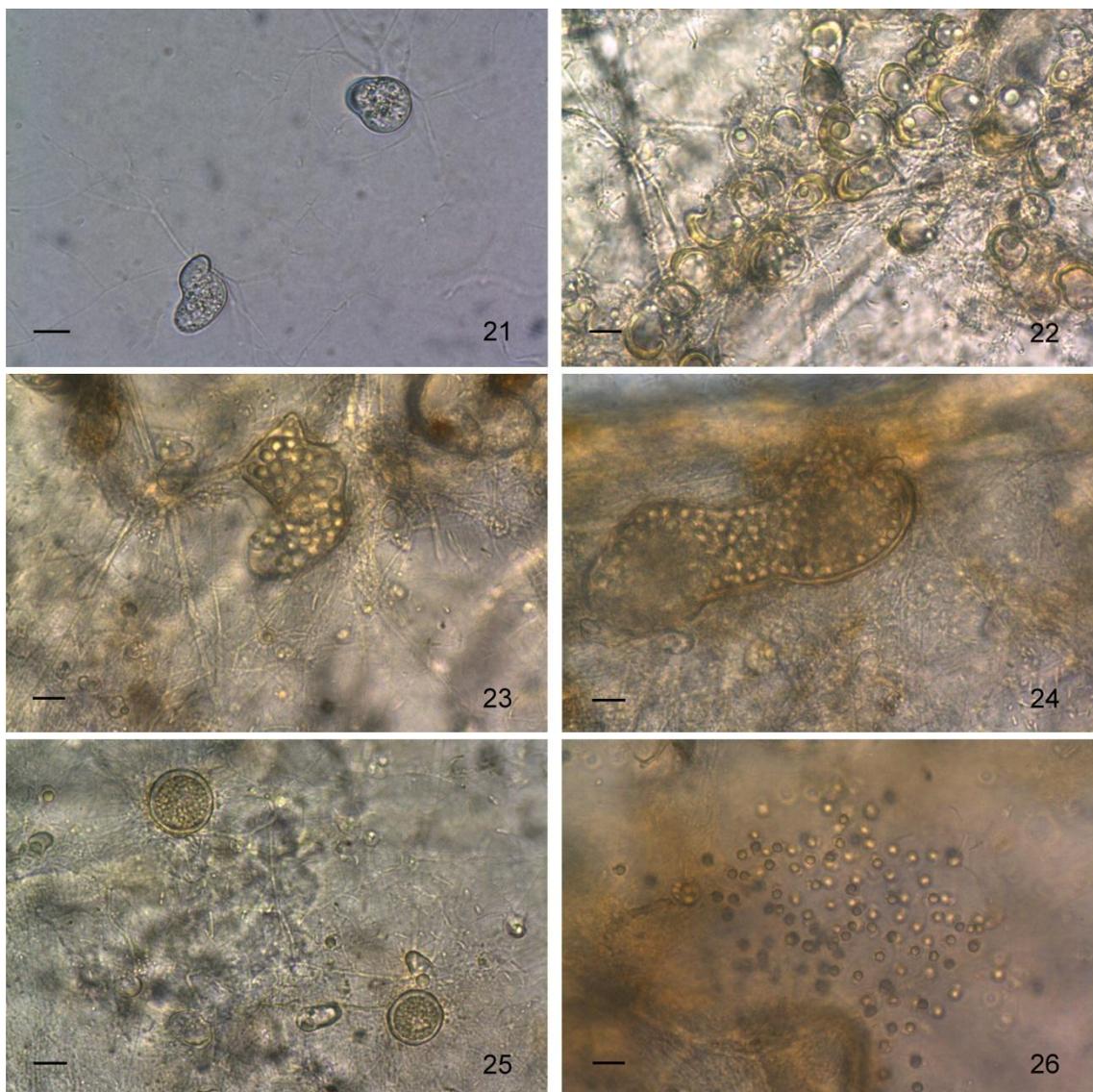
reniformes, 20-45 x 40-112  $\mu\text{m}$ . Rizóides ramificados, tornando-se espessos quando velhos. Zoósporos esféricos, 5-7,5  $\mu\text{m}$  diâm., ou ovais, 5-7,5 x 5-7,5  $\mu\text{m}$ , com uma gotícula lipídica. Esporos de resistência lisos, coloração âmbar e conteúdo interno granular com um vacúolo central conspícuo, predominantemente esféricos, 15-20  $\mu\text{m}$  diâm., subesféricos, 15-20 x 12,5-17,5  $\mu\text{m}$ , ocasionalmente ovais, 20-25 x 12,5-17,5  $\mu\text{m}$ ; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de água, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2013, 04-VI-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445874).

Distribuição no Brasil: **Minas Gerais, São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2010, 2012, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: *Chytriomycetes appendiculatus* é prontamente distinguível das outras espécies do gênero por apresentar zoosporângios operculados apendiculados, extremamente variáveis em forma e tamanho. Segundo Karling (1947b), alguns espécimes podem atingir até 250  $\mu\text{m}$  diâm., e por isso considerada a maior espécie do gênero. A característica apendiculada do zoosporângio pode ser atribuída a um processo de espessamento desigual da parede durante o desenvolvimento dos zoósporos. Conseqüentemente, a expansão e crescimento parecem ser retardados em um dos lados e o zoosporângio aumenta e expande-se no lado oposto, tornando-se assimétrico, possibilitando assim, a formação de múltiplos formatos e tamanhos. Os zoosporângios examinados são menores que os descritos por Karling (1947b), que cita zoosporângios irregulares de 20-180 x 35-250  $\mu\text{m}$ , mas concordam com Pires-Zottarelli & Gomes

(2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009). O tamanho dos zoósporos e esporos de resistência estão de acordo com a descrição original de Karling (1947b).



Figuras 21-26. *Chytrium appendiculatus* Karling. 21. Zoosporângios em meio de cultura PMTG. 22. Início de desenvolvimento dos zoosporângios. 23-24. Zoosporângios irregulares. 25. Esporos de resistência. 26. Zoósporos encistados. Barras = 10  $\mu$ m.

*Chytriumyces spinosus* Fay, Mycologia 39: 152. 1947.

Figuras 27-29

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Rizóides ramificados e longos surgindo da porção basal do zoosporângio. Zoosporângios hialinos, operculados, obpiriformes, 20-37,5 x 25-40 µm, alguns esféricos, 22,5-50 µm diâm; parede com ornamentações cônicas em forma de espinhos simples. Zoósporos esféricos, 3-6 µm diâm. subesféricos, 5-10 x 5-7,5 µm, com uma única gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de água, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 7-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2013, 04-VI-2013, 05-VI-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445877).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Piauí, São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012).

Comentários: A principal característica de *C. spinosus* é a produção de zoosporângios operculados ornamentados com espinhos simples. Segundo Fay (1947), a ornamentação pode ser observada nos estágios iniciais de desenvolvimento dos zoosporângios e inicialmente os espinhos são similares a papilas, característica observada nos isolados do PEIC. No entanto, a presença de espinhos bifurcados como descrito por Fay (1947) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007), não foi observada nos isolados examinados, concordando com os descritos por Nascimento & Pires-Zottarelli (2009). De acordo com Fay (1947), durante o desenvolvimento, uma grande quantidade de material viscoso, opaco e homogêneo, se acumula no ápice do zoosporângio, empurrando os zoósporos para a região basal, enquanto a região próxima ao opérculo parece

relativamente vazia, característica observada na maioria dos isolados do PEIC. Ainda segundo a autora, os zoósporos são liberados em uma matriz gelatinosa hialina e podem permanecer imóveis por até 60 minutos antes da dispersão, mecanismo não observado nos isolados examinados. As características dos zoosporângios examinados concordam com a descrição de Fay (1947), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012) e dos zoósporos concordam com a descrição de Pires-Zottarelli & Gomes (2007).

*Phlyctochytrium aureliae* Ajello, Mycologia 37: 110. 1945.

Figura 30

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal delicado e ramificado. Zoosporângios inoperculados, hialinos, esféricos 10-27 µm diâm. e subesféricos 25-27 x 20-25 µm, ornamentados com espinhos bifurcados. Liberação dos zoósporos e produção de esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola, palha de milho e grãos de pólen, amostras de água, 21-VIII-2012; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445894).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012).

Comentários: A principal característica de *P. aureliae* é a produção de zoosporângios hialinos, apofisados, ornamentados com espinhos bifurcados. Segundo Ajello (1945) nenhuma outra espécie do gênero produz zoosporângios com este tipo de ornamentação. Os zoosporângios examinados concordam com a descrição original, mas são pouco menores que os descritos por Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012), as quais citam de 25-37,5 µm diâm. e 20-50 µm diâm.,

respectivamente. Essa espécie foi citada pela primeira vez para o Brasil por A.I. Milanez nos municípios de Limeira, Pedrinhas e Riacho Grande, Estado de São Paulo (Pires-Zottarelli & Gomes, 2007).

*Phlyctochytrium furcatum* Sparrow, Archiv für Mikrobiologie 3: 180. 1966.

Figuras 31-32

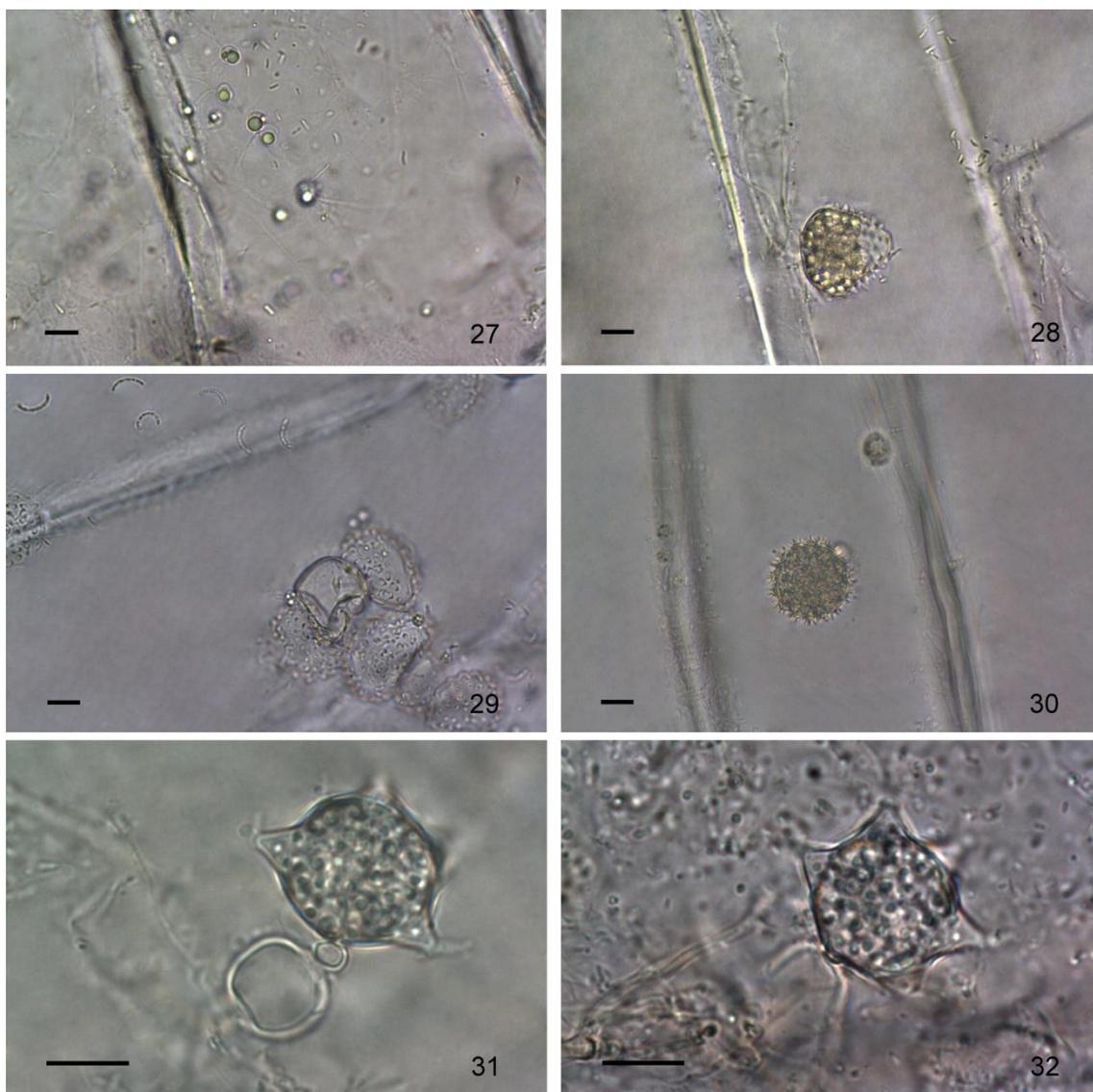
Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal delicado, ramificado, surgindo de apófises esféricas e compostas, 10-12 µm diâm. Zoosporângios inoperculados, hialinos, apofisados, irregulares 20-25 x 25-30 µm, com variável número de eixos (3 a 5) cada um com dois pares de espinhos hialinos terminais. Liberação dos zoósporos e formação de esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola, amostras de água, 6-XI-2012; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445895).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Milanez *et al.* 2007).

Comentários: As principais características de *P. furcatum* são a produção de zoosporângios ornamentados com dois pares de espinhos hialinos terminais e presença de grandes apófises compostas. A visualização das apófises compostas pode ser problemática quando a mesma se desenvolve em grãos de pólen, pois o sistema rizoidal fica imerso no substrato, como relatado por Sparrow (1966). Como os isolados do PEIC foram encontrados em epiderme de cebola, a presença desta estrutura pôde ser facilmente visualizada. Sparrow (1966) compara *P. furcatum* com *P. dentatum* (Rosen) de Wild, *P. dentiferum* Sparrow e *P. urceolare* Sparrow, mas assume que o formato dos zoosporângios juntamente com a posição dos espinhos são únicas em *P. furcatum*. Os zoosporângios concordam com Sparrow (1966), embora os isolados examinados tenham

mostrado menor plasticidade morfológica. Os isolados do PEIC não produziram esporos de resistência. Esta espécie foi citada no Brasil por Booth (1979) de solo de dunas de Cananéia, São Paulo; no entanto, o autor não descreveu o espécime coletado.



Figuras 27-29. *Chytridiomyces spinosus* Fay. 27. Zoósporos encistados. 28. Zoosporângio ornamentado. 29. Zoosporângios vazios. Figura 30. *Phlyctochytrium aureliae* Ajello. Zoosporângio ornamentado. Figuras 31-32. *Phlyctochytrium furcatum* Sparrow. 31-32. Zoosporângio ornamentado com espinhos terminais e presença de apófises compostas. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

*Karlingiomyces dubius* (Karling) Sparrow, Aquatic Phycomycetes, 2<sup>nd</sup> ed., p. 561, 1960.

Basiônimo: *Karlingia dubia* Karling. Mycologia, 41: 513. 1949.

Figuras 33-35

Talo eucárpico, monocêntrico, extramatricial. Sistema rizoidal ramificado com numerosas constrictões surgindo de várias porções do zoosporângio. Zoosporângios lisos, hialinos, exoperculados, esféricos, 27,5-52,5 µm diâm; subesféricos, 30-62,5 x 25-55 µm e ovais, 45-62,5 x 27,5-50 µm, formando até 2 papilas de descarga. Zoósporos encistados, 7 µm diâm. hialinos, com uma única gotícula lipídica. Esporos de resistência abundantes, coloração âmbar, esféricos, 12,5-27,5 µm diâm; e ovais, 10-25 x 12,5-27,5 µm, apresentando numerosas ornamentações rugosas a verrucosas, conteúdo granular.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de água, 26-II-2-13, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445879).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: Segundo a descrição original de Karling (1949), as características principais que distinguem esta espécie são os esporos de resistência de parede rugosa a verrucosa de coloração âmbar e o exopérculo. Além disso, os zoósporos são consideravelmente maiores que os anteriormente descritos para as espécies deste gênero. Outra característica notável de *K. dubius* são os rizóides irregularmente constrictos de parede espessa, principalmente em talos maduros. As constrictões dos rizóides, no entanto, não ocorrem em todos os espécimes e numerosos talos podem ser lisos com poucas ou nenhuma constrictão (Karling, 1949), característica observada nos espécimes do PEIC. As características dos zoosporângios examinados concordam com

os descritos por Karling (1949) e Sparrow (1960), mas são menores que os descritos por Pires-Zottarelli & Rocha (2007), que citam de 37-80 x 55-120  $\mu\text{m}$ . Já os zoósporos concordam com as descrições de Karling (1949), Sparrow (1960) e Pires-Zottarelli & Rocha (2007). Os esporos de resistência concordam com as descrições de Karling (1949) e Sparrow (1960), mas são menores que os descritos por Pires-Zottarelli & Rocha (2007), que citam esporos de resistência esféricos de 17-50  $\mu\text{m}$  diâm. e ovais de 25-45 x 40-62  $\mu\text{m}$ .

De acordo com a revisão de *Karlingiomyces* elaborada por Blackwell *et al.* (2004), existe um grande debate sobre a classificação taxômica de *K. dubius*. Willoughby (1957) reconheceu *Karlingia dubia* (Karling, 1949), mas relatou a presença de um único exopérculo. Sparrow (1960) transferiu esta espécie para um novo gênero, *Karlingiomyces*, devido a presença do exopérculo. Karling (1967) não aceitou a criação do gênero *Karlingiomyces*, e manteve todas as espécies em *Karlingia*. Dogma (1973, 1974a) baseando-se nas diferenças de operculação, reconheceu três gêneros do “rhizophlyctoid assemblages” (*Rhizophlyctis*, *Karlingia* e *Karlingiomyces*) e aceitou a transferência de *Karlingia dubia* para *Karlingiomyces*, o que é por ora aceito no presente estudo.

***Karlingiomyces granulatus*** (Karling) Sparrow, Aquatic Phycomycetes, 2<sup>nd</sup> ed., 563. 1960.

Basiônimo: *Karlingia granulata* Karling, Mycologia 39: 57. 1947

Figuras 36-38

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal ramificado, surgindo de vários pontos do zoosporângio, com rizóides constrictos e irregulares, hialinos quando jovens, tornando-se marrom e espessados quando velhos.

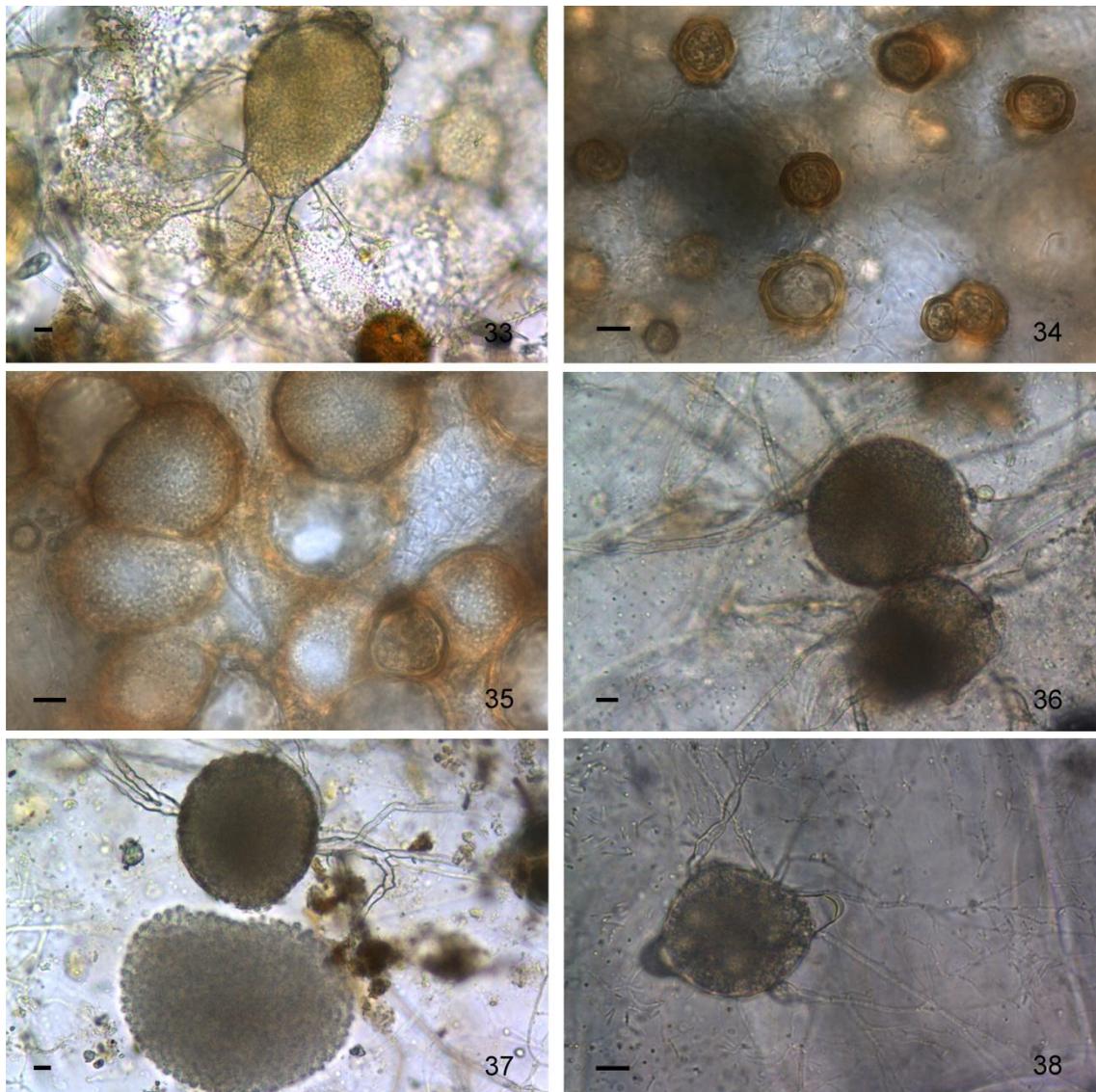
Zoosporângios lisos e hialinos, exoperculados e endoperculados, esféricos, 25-62,5 µm diâm; subesféricos, 27,5-50 x 25-55 µm, e ovais 37,5-55 x 40-62,5 µm; parede podendo colapsar e se tornar enrugada após liberação dos zoósporos. Zoósporos esféricos 5-7,5 µm diâm; com numerosas gotículas lipídicas hialinas. Esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de água, 6-XI-2012; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445880).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Minas Gerais, Rondônia, São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2010, 2012).

Comentários: Esta espécie foi originalmente descrita por Karling (1947c) como saprofítica em detritos vegetais em amostras de solo de São Carlos, Mato Grosso, Brasil. O nome da espécie se deve à característica peculiar das gotículas lipídicas dos zoósporos. Enquanto os zoósporos das outras espécies de *Karlingiomyces* possuem uma única gotícula lipídica que se destaca, *K. granulatus* apresenta numerosas gotículas, conferindo ao zoósporo um aspecto granular. Segundo Karling (1947c), uma das características distintas da espécie é a presença de exopérculo e endopérculo, algumas vezes no mesmo zoosporângio, embora a maioria dos zoosporângios sejam exoperculados. Ainda de acordo com Karling (1947c), no momento da liberação dos zoósporos, ocorre a formação de uma grande massa de zoósporos que permanecem imóveis por um longo período e gradualmente se dispersam, característica observada nos espécimes do PEIC. As características apresentadas pelos espécimes concordam com Rocha & Pires-Zottarelli (2002) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007), mas apresentam zoosporângios menores que os descritos por Karling (1947c) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2010), que citam respectivamente de 8-240 µm diâm. e 50-140 µm

diâm. O primeiro relato desta espécie para o Brasil foi de Karling (1947c) em amostras de solo do Estado de Mato Grosso (Nascimento & Pires-Zottarelli, 2010).



Figuras 33-35. *Karlingiomyces dubius* (Karling) Sparrow. 33. Zoosporângio. 34-35. Esporos de resistência. 36-38. *Karlingiomyces granulatus* (Karling) Sparrow. 36. Zoosporângio operculado. 37. Liberação dos zoósporos. 38. Detalhe do endoperculo. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

## ENDOCHYTRIACEAE

*Entophlyctis luteolus* Longcore, Mycologia 87: 27. 1995.

Figuras 39-44

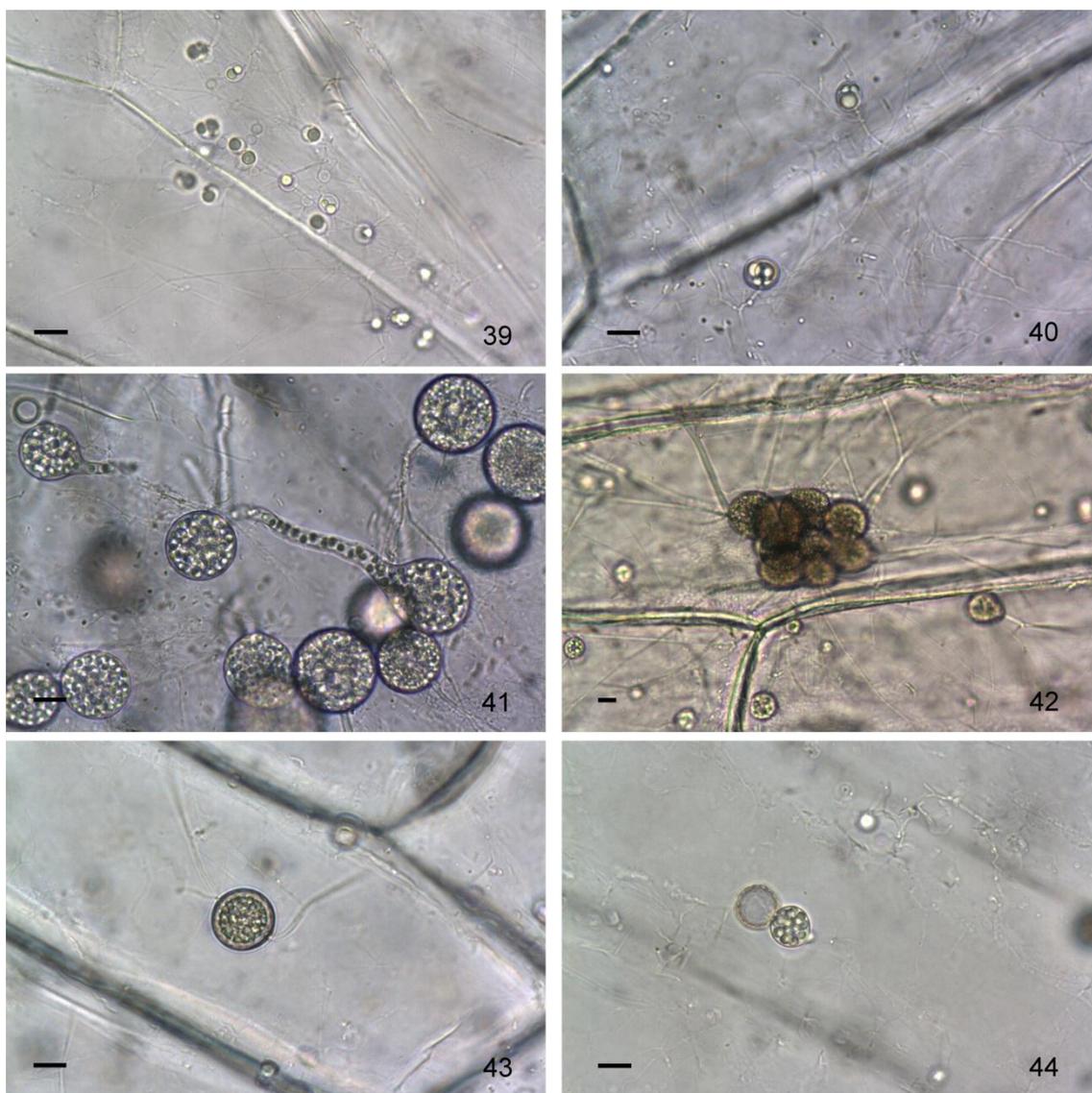
Talo monocêntrico, eucárpico, epibiótico ou endobiótico. Sistema rizoidal delicado, normalmente com dois eixos e pequenas dilatações na base dos rizóides. Zoosporângios hialinos, inoperculados, parede lisa, esféricos, 20-37,5 µm diâm.; 1 ou 2 tubos de liberação de 10-62,5 µm compr. Zoósporos hialinos, encistados, 4-6 µm diâm. com uma grande gotícula lipídica. Esporos de resistência esféricos, 12,5-20 µm diâm. de conteúdo granular, parede lisa, amarelada, 2-3 µm de espessura e porção interna serrilhada, funcionando como prosperângio.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de água, 21-VIII-2012, G.H. Jerônimo s.n (CCIBt 4018, SP 445883).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Pires-Zottarelli *et al.* 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012).

Comentários: As principais características de *E. luteolus* são os esporos de resistência de coloração amarelada, parede interna serrilhada, conteúdo granular e presença de cisto do zoósporo. Como relatado por Pires-Zottarelli *et al.* (2007), os zoosporângios são produzidos abundantemente, o que pôde ser observado nos isolados examinados. A produção de muitos esporos de resistência permitiu que esta espécie permanecesse viável por longo período (2 meses) nos substratos celulósicos, principalmente epiderme de cebola. Segundo Longcore (1995), *E. luteolus* cresce endobioticamente em epiderme de cebola e o tamanho do zoosporângio é, em alguns casos, limitado ao tamanho da célula do substrato, como observado em alguns isolados do PEIC. Os zoosporângios observados concordam com os descritos por Longcore (1995), a qual cita zoosporângios

esféricos de 11-37  $\mu\text{m}$  diâm; mas são pouco menores que os isolados descritos por Pires-Zottarelli *et al.* (2007), que citam zoosporângios de 15-42,5  $\mu\text{m}$  diâm. O tamanho dos esporos de resistência e zoósporos concordam com Longcore (1995) e Pires-Zottarelli *et al.* (2007). Entre os espécimes observados no PEIC, os esporos de resistência funcionaram como prosperângios, principalmente em isolados velhos, como também relatado por Longcore (1995) e Pires-Zottarelli *et al.* (2007).



Figuras 39-44. *Entophlyctis luteolus* Longcore. 39. Zoósporos encistados e cisto do zoósporo. 40. Início do desenvolvimento. 41. Zoosporângios com tubo de liberação dos zoósporos. 42. Zoosporângios agregados. 43. Esporo de resistência. 44. Prosperângio. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

*Entophlyctis lobata* Willoughby & Townley, Transactions of the British Mycological Society 44: 180. 1961.

Figuras 45-47

Talo monocêntrico, eucárpico, intramatricial. Sistema rizoidal extenso e muito ramificado. Zoosporângios inoperculados, com ornamentações lobuladas e/ou papiladas, raramente lisos, subesféricos, 17,5-27,5 x 15-25 µm; esféricos, 22,5-32,5 µm diâm; alguns irregulares. Zoósporos com uma gotícula lipídica alaranjada. Esporos de resistência lobulados, com porção interna alaranjada, subesféricos, 22,5-25 x 20-22,5 µm; esféricos, 18-25 µm diâm; e ovais, 18-20 x 12-15 µm; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em larvas de insetos da ordem *Odonata* em amostras de água, 04-VI-2013; G.H. Jerônimo s.n (SP 445882).

Distribuição no Brasil: **Amazonas e Piauí** (Milanez *et al.*, 2007).

Comentários: As principais características de *E. lobata* são a produção de zoosporângios e esporos de resistência profundamente lobulados e zoósporos com uma única gotícula lipídica alaranjada. Outra importante característica, não observada nestes isolados, é a presença do cisto do zoósporo na parede do zoosporângio, embora a descrição original de Willoughby & Townley (1961) cite que os zoosporângios maduros podem não apresentar cisto ou ele pode ser removido durante a liberação dos zoósporos, ou ainda, a presença de papilas muito espessas podem dificultar a visualização do cisto. Os isolados do PEIC não produziram tubos de liberação dos zoósporos ou os tubos produzidos foram muito curtos e as ornamentações lobuladas dos zoosporângios podem ter mascarado a observação da estrutura, fato também mencionado por Willoughby & Townley (1961). Os zoosporângios do espécime examinado são menores que os observados por Willoughby & Townley (1961) e Rocha (2002), que citam

zoosporângios esféricos de 12-50 µm diâm. e 15-50 µm diâm., respectivamente. Os esporos de resistência concordam com os descritos por Willoughby & Townley (1961) e Rocha (2002). É a primeira citação para o Estado de São Paulo.

*Diplophlyctis asteroidea* Dogma, Transactions of the British Mycological Society 67: 255. 1976.

Figuras 48-50

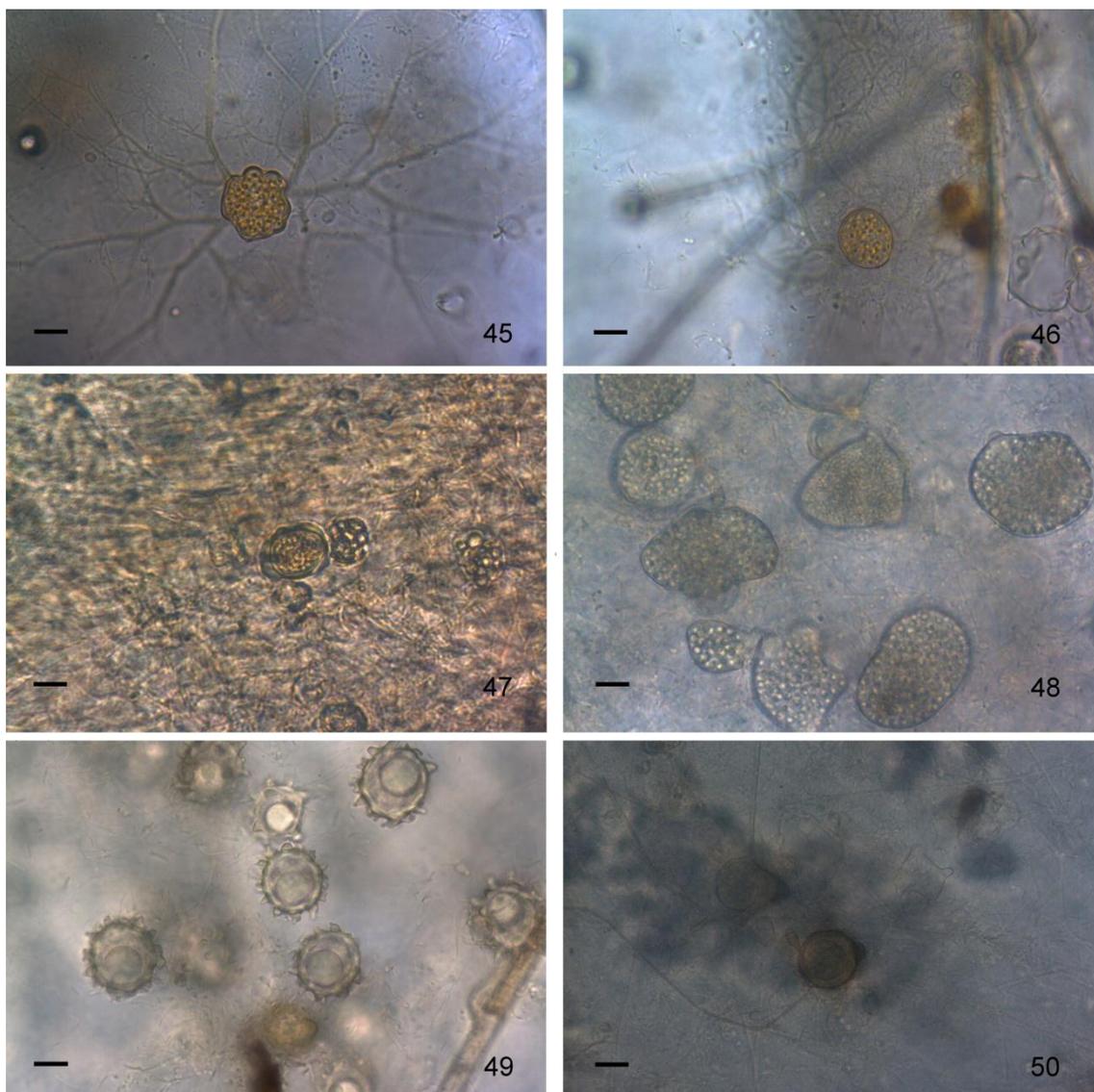
Talo monocêntrico, eucárpico, intramatricial. Sistema rizoidal bem desenvolvido. Zoosporângios inoperculados, lisos, hialinos, apofisados 10-17,5 µm diâm; esféricos, 22,5-32,5 µm diâm.; subesféricos, 25-35 x 22,5-32,5 µm e ovais 25-47,5 x 22,5-35 µm, alguns irregulares e lobulados, com 1 ou 2 papilas ou tubos de descarga por zoosporângio. Zoósporos esféricos, 2-4 µm diâm; e ovais 3-4 x 2-3 µm, com uma pequena gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência apofisados, esféricos 22,5-27,5 µm diâm; subesféricos 20-25 x 22,5-27,5 µm e ovais 20-25 x 25-32,5 µm, com ornamentações cônicas, conteúdo hialino, com 1 a 3 grandes glóbulos refrativos; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de água, 7-XI-2012, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445885).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: A principal característica de *D. asteroidea* é a produção de esporos de resistência com ornamentações cônicas, que conferem a esta estrutura um aspecto estrelado. Outra característica marcante é a presença de um apêndice em forma de haste, nos zoosporângios e esporos de resistência, estrutura observada somente nos esporos de

resistência dos isolados do PEIC. Segundo descrição original de Dogma (1976), essa espécie é normalmente encontrada em pequenos corpos de água ácidos e se mostram frequentemente associada com *Chytrium appendiculatus*. Os espécimes examinados foram isolados de corpos d'água de pH levemente ácido (4,9 a 5,9), mas a presença de *C. appendiculatus* na mesma isca não foi observada. Dogma (1976) ainda relata que a utilização de água com pH ácido é de crucial importância para manutenção desta espécie em meios de cultura. O tamanho dos zoosporângios e esporos de resistência observados nos isolados examinados concordam com Dogma (1976), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Pires-Zottarelli & Rocha (2007).



Figuras 45-47. *Entophlyctis lobata* Willoughby & Townley. 45. Zoosporângio ornamentado. 46. Zoosporângio liso. 47. Esporo de resistência. Figuras 48-50. *Diplophlyctis asteroidea* Dogma. 48. Zoosporângios. 49. Esporos de resistência ornamentados. 50. Estruturas de resistência com apêndice. Barras = 10 µm.

***Diplophlyctis complicata*** (Willoughby) Dogma, Nova Hedwigia 25: 144. 1974

Basiônimo: *Nephrochytrium complicatum* Willoughby, Nova Hedwigia 3: 440. 1962.

Figuras 51-56

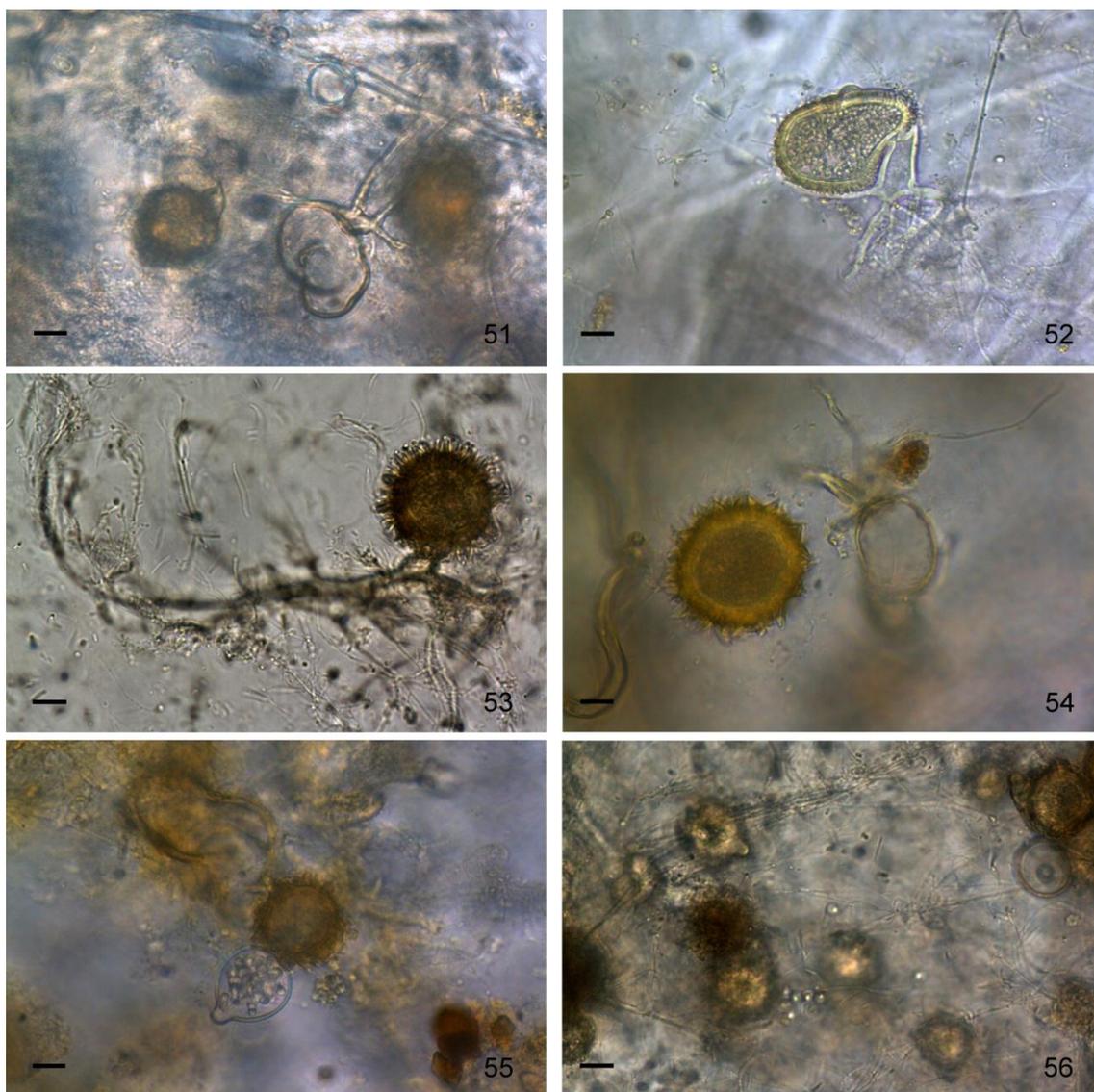
Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal extensivo e ramificado. Zoosporângios lisos, inoperculados, irregulares, 15-42,5 x 15-37,5 µm, com vestígio dos cistos dos zoósporos; zoosporângios de resistência de conteúdo hialino, granular e parede amarelada espessa. Zoósporos encistados, 5 µm diâm., com um glóbulo lipídico hialino. Esporos de resistência apofisados, parede ornamentada com estruturas cônicas semelhantes a espinhos espessos, coloração variando entre âmbar e amarelo, esféricos, 25-40 µm diâm. funcionando como prosperângios na germinação.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de água, 21-VIII-2012; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445886).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007).

Comentários: A principal característica de *D. complicata* é a produção de esporos de resistência apofisados, de coloração amarelo-âmbar e ornamentações cônicas, semelhantes a espinhos espessos. No trabalho de transferência de gênero, elaborado por Dogma (1974b), o autor cita a capacidade dos esporos de resistência de funcionar como prosperângios, como observado nos isolados do PEIC. Willoughby (1962) classificou essa espécie dentro do gênero *Nephrochytrium* pela presença de apófise e cisto do zoósporo no zoosporângio, e ainda liberação dos zoósporos pela dissolução do tubo de liberação. Segundo Dogma (1974b), a falta de informações precisas sobre os mecanismos de liberação, levou Willoughby (1962) a classificação genérica equivocada. Ainda de acordo com Dogma (1974b) a aparente inoperculação dos zoosporângios é fundamental para transferência desta espécie para o gênero *Diplophlyctis* já que *Nephrochytrium* é operculado. Segundo Dogma (1974b), *D. complicata* cresce bem em iscas quitinosas mas não em outros tipos de substratos, o que

foi observado nos isolados examinados, embora Rocha & Pires-Zottarelli (2002) citem o crescimento em substratos celulósicos (epiderme de cebola e palha de milho). Os zoosporângios dos isolados do PEIC são menores que os descritos por Dogma (1974b), Pires-Zottarelli (1999) e Rocha & Pires-Zottarelli (2002), que citam zoosporângios de 12-80 x 7-65  $\mu\text{m}$ , mas são semelhantes aos descritos por Pires-Zottarelli & Rocha (2007). Os zoósporos observados concordam com Pires-Zottarelli & Rocha (2007), mas são menores que os da descrição de Dogma (1974b) que cita zoósporos ovais entre 5,5-6,5 x 3,5-4,5  $\mu\text{m}$  e Rocha & Pires-Zottarelli (2002) que citam até 7,5  $\mu\text{m}$  diâm. Os esporos de resistência concordam com Dogma (1974b), mas são maiores que as descrições de Rocha & Pires-Zottarelli (2002) e Pires-Zottarelli & Rocha (2007) que mencionam dimensões de 17,5-25  $\mu\text{m}$  diâm. e 20-25  $\mu\text{m}$  diâm., respectivamente. Essa espécie foi descrita pela primeira vez para o país por Schoenlein-Crusius *et al.* (2006) para a cidade de Cubatão, Estado de São Paulo.



Figuras 51-56. *Diplophlyctis complicata* (Willoughby) Dogma. 51. Zoosporângio vazio. 52. Zoosporângio de resistência. 53-54. Esporos de resistência ornamentados. 55. Prosporângio. 56. Zoósporos. Barras = 10  $\mu$ m.

*Diplophlyctis intestina* (Schenk) Schröter, Engler and Prantl, *Natürlichen Pflanzenfam* 1: 78. 1892.

Basiônimo: *Rhizidium intestinum* Schenk, *Phys. Med. Gesell Würzburg* 8: 235-259. 1858.

Figuras 57-59

Talo eucárpico, monocêntrico, intramatricial. Sistema rizoidal ramificado formando vários eixos a partir de uma apófise basal, hemisférica, 5-10 x 10-15  $\mu\text{m}$  e esférica, 7,5-10  $\mu\text{m}$  diâm. Zoosporângios lisos, hialinos, inoperculados, apofisados, esféricos, 12,5-27,5  $\mu\text{m}$  diâm. e subesféricos 12,5-35 x 15-27,5  $\mu\text{m}$ , formando um único tubo de liberação dos zoósporos muito longo, de até 150  $\mu\text{m}$  compr. Zoósporos encistados, 5  $\mu\text{m}$  diâm. com uma única gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência castanhos, parede espessa, apofisados, ornamentados com finos filamentos semelhantes a espinhos compactos, esféricos, 17,5-22,5  $\mu\text{m}$  diâm. e hemisféricos, 17,5-22,5 x 20-22,5  $\mu\text{m}$ ; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola, amostras de água, 6-XI-2012, 7-XI-2012, 04-VII-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445887).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: As principais características de *D. intestina* são a presença de uma apófise basal no zoosporângio e produção de esporos de resistência, geralmente esféricos, apofisados, de coloração castanha e ornamentados com finos filamentos semelhantes a espinhos compactados. Karling (1977) cita a possibilidade de formação de até seis tubos de liberação dos zoósporos, que podem se ramificar, características não apresentadas pelos isolados do PEIC, que formaram sempre um tubo não ramificado por zoosporângio, como também relatado por Jesus *et al.* (2013). Sparrow (1939) e Haskins (1950) evidenciaram a possibilidade de formação dos esporos de resistência de modo sexuado por meio da fusão do conteúdo de dois talos pela anastomose dos rizóides, mecanismo não visualizado nos isolados do PEIC. Os zoosporângios examinados são menores que os descritos por Sparrow (1960) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009),

que citam zoosporângios acima de 80 µm diâm. e de 17,5-75 µm, respectivamente, mas se aproximam da descrição de Jesus *et al.* (2013). A apófise dos zoosporângios são maiores que as descritas por Sparrow (1960), que cita entre 3-6 µm diâm., mas novamente concorda com Jesus *et al.* (2013). Os zoósporos concordam com Sparrow (1960), mas os esporos de resistência são menores que os descritos Sparrow (1960) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009), que citam respectivamente, dimensões de 22-28 µm diâm. e 20-30 µm diâm.

*Diplophlyctis sarcoptoides* (H.E. Petersen) Dogma, Nova Hedwigia 25: 122. 1974.

Basiônimo: *Asterophlyctis sarcoptoides* H.E. Petersen, Journal de Botanique 17: 218. 1903.

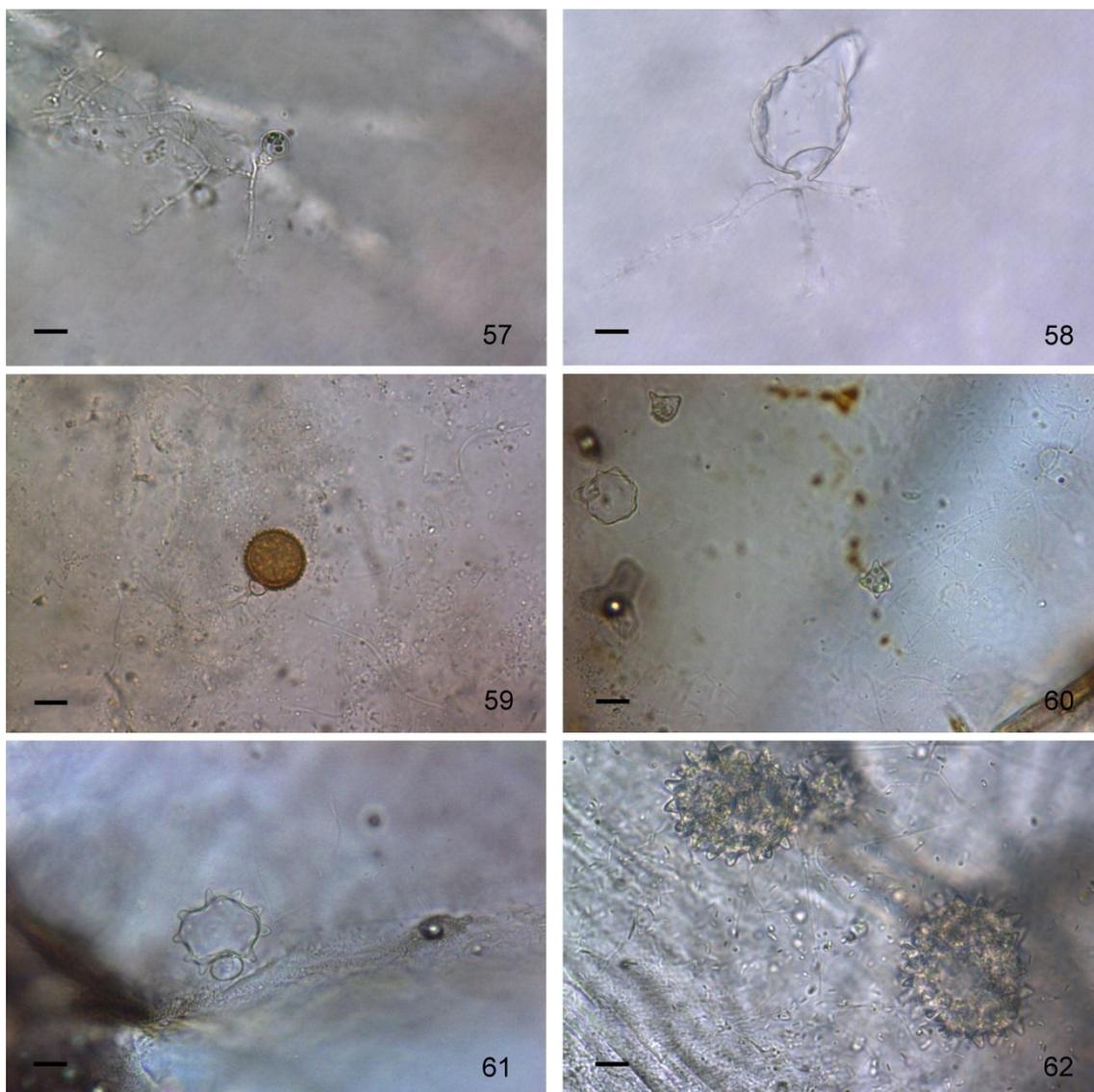
Figuras 60-62

Talo eucárpico, monocêntrico, intramatricial. Sistema rizoidal fino e delicado, geralmente com dois eixos surgindo a partir de uma apófise hemisférica, 5-8 x 9-12 µm. Zoosporângios inoperculados, apofisados, hialinos, subesféricos, 20-22 x 23-25 µm, hemisféricos 15-35 x 20-44 µm e irregulares; ornamentações papiladas ou espinhosas distribuídas por toda a superfície do zoosporângio. Liberação dos zoósporos e formação de estruturas de resistência não observadas.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de água, 21-VIII-2012, 04-VIII-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP- 445888).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Minas Gerais, Piauí, Rondônia, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: As principais características de *D. sarcoptoides* são a produção de zoosporângios e esporos de resistência apofisados, ornamentados com papilas ou espinhos. Em um estudo metuculoso sobre citologia e desenvolvimento conduzido por Antikajian (1949), com isolados monospóricos do Brasil, Libéria e Connecticut (Estados Unidos), a autora mostrou que os zoosporângios e esporos de resistência podem também desenvolver-se a partir de dilatações do tubo germinativo. No estudo, 1000 talos foram analisados em substratos quitinosos e meios de cultura e nos isolados de Connecticut 30% se desenvolveram a partir do tubo germinativo, enquanto nos do Brasil e Libéria esta porcentagem regrediu para 9 e 11 %, respectivamente (Antikajian 1949 apud Karling 1977). Dogma (1974b) observou que em isolados de culturas puras os zoosporângios desenvolviam-se a partir do tubo germinativo como em membros do gênero *Entophlyctis*, e devido a esse tipo de crescimento, e também ao mecanismo de reprodução sexuada, o autor transferiu as espécies do gênero *Asterophlyctis* proposto por Petersen, (*A. sarcoptoides* e *A. irregulares*) para o gênero *Diplophlyctis*. O tamanho dos zoosporângios e apófise dos isolados examinados são semelhantes aos descritos por Sparrow (1960) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009). Essa espécie foi descrita pela primeira vez para o Brasil por Karling (1945a) para o Estado de Rondônia, ainda sob a denominação de *Asterophlyctis sarcoptoides*.



Figuras 57-59. *Diplophlyctis intestina* (Schenk) Schröter. 57. Início de desenvolvimento. 58. Zoosporângio com apófise basal. 59. Esporo de resistência ornamentado. Figuras 60-62. *Diplophlyctis sarcoptoides* (H.E. Petersen) Dogma. 60. Início do desenvolvimento. 61. Zoosporângio apofisado. 62. Zoosporângios ornamentados. Barras = 10 µm.

## CLADOCHYTRIALES

### CLADOCHYTRIACEAE

*Cladochytrium replicatum* Karling, American Journal of Botany 18: 538. 1931.

Figuras 63-65

Talo eucárpico, policêntrico, intramatricial. Sistema rizoidal extensivo, delicado, consistindo de finos filamentos ramificados, com uma a várias células turbinadas intercalares. Zoosporângios lisos, inoperculados, não apofisados, normalmente terminais, esféricos, 10-20 µm diâm., e ovais, 22-14 x 10-18 µm, produzindo um único tubo de liberação de 5-12 µm compr. Zoósporos encistados, 5-7,5 µm diâm., com uma única gotícula lipídica alaranjada, variando de 7 a 12 por zoosporângio. Esporos de resistência esféricos, 12,5-17,5 µm diâm. e ovais, 17,5-19 x 12,5-16 µm, com um grande glóbulo lipídico alaranjado; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de água, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2013, 04-VII-2013, 05-VII-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4014; SP 445868).

Distribuição no Brasil: **Acre, Amazonas, Ceará, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rondônia, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: A principal característica de *C. replicatum* que o distingue das demais espécies do gênero é a produção de zoósporos e esporos de resistência com uma gotícula lipídica laranja devido à presença de carotenóides. É uma espécie muito abundante e frequente no Brasil, podendo ser encontrada em substratos celulósicos em água doce e no solo. *C. replicatum* foi originalmente observado nas células das plantas *Eriocaulon septangulare* With, *E. compressum* Lamarck e *Elodea canadensis* Michaux e das algas *Cladophora glomerata* (Linnaeus) Kützing e *Spirogyra* sp., causando

hipertrofia e malformação da planta e alga hospedeira, e por isso foi denominado como fracamente parasita por Karling (1931). As características dos zoosporângios e zoósporos concordam com as descrições de Karling (1931), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zotarrelli (2009). Os esporos de resistência concordam com as descrições de Nascimento & Pires-Zotarrelli (2009, 2012).

*Cladochytrium tenue* Nowakowski, Cohn Beiträge zur Biologie der Pflagen 2: 92. 1877.

Figuras 66-68

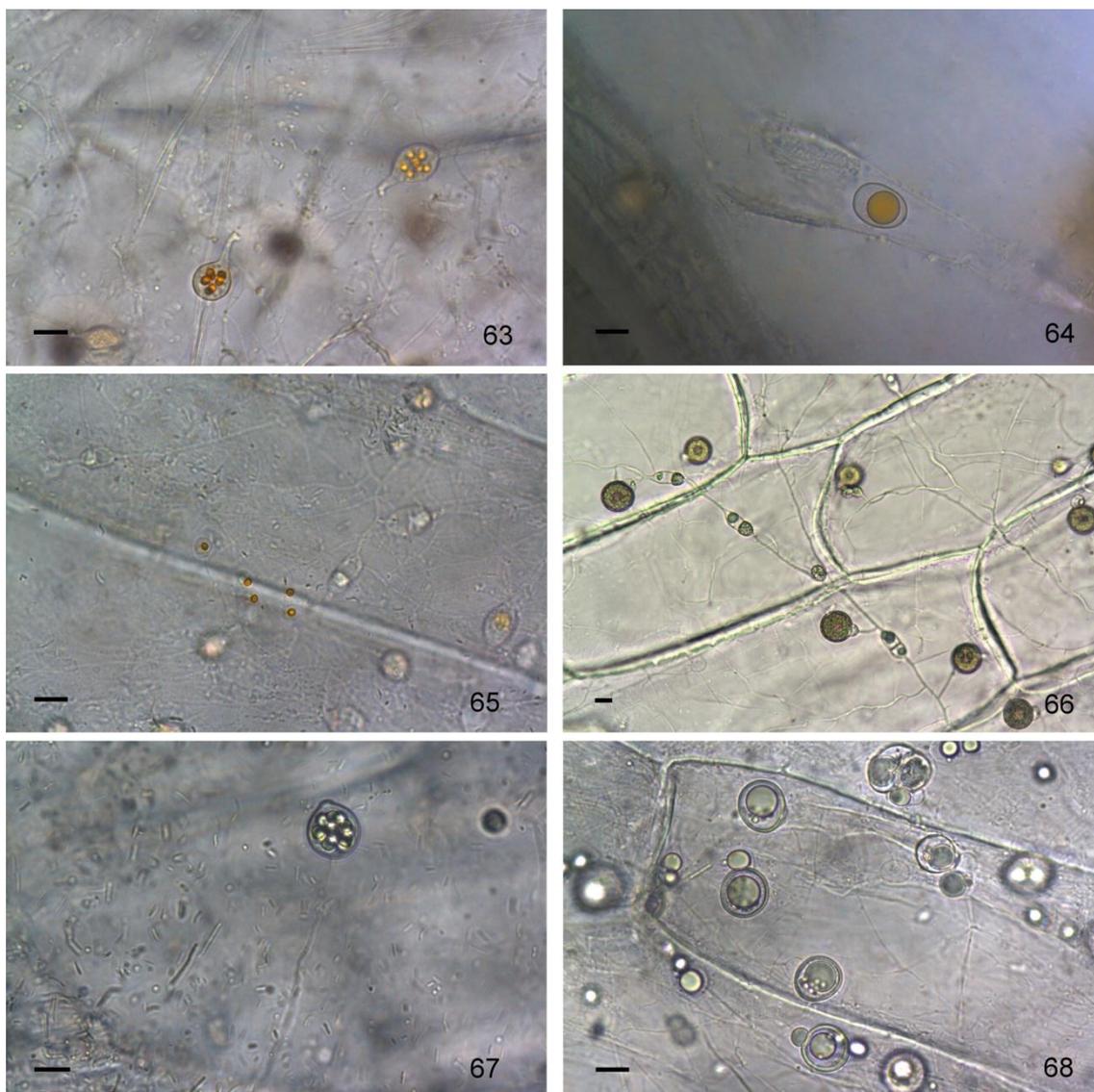
Talo eucárpico, policêntrico, extra-intramatrical. Rizomicélio extensivo, com numerosas células turbinadas fusiformes, 10-26 x 7-12 µm, ovais, 10-14 x 8-12,5 µm e células intercalares hialinas, esféricas 12,5-17,5 µm diâm., e subesféricas 10-12,5 x 12,5-15 µm. Zoosporângios inoperculados, lisos, delicados, terminais, piriformes, 15-25 x 12,5-17,5 µm; esféricos, 12,5-17,5 µm diâm.; e ovais, 15-20 x 12,5-17,5 µm. Zoósporos encistados, 5 µm diâm. com uma gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência hialinos, lisos, esféricos, 12,5-17,5 µm diâm.; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola, amostras de água, 21-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2013, 5-VII-2013. *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt: 4013; SP 445867).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Mato Grosso, Piauí, Rondônia, São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012).

Comentários: A característica principal de *C. tenue* é a presença de células intercalares no rizomicélio e a produção de estruturas de resistência hialinas. A produção de zoosporângios hialinos foi observada, principalmente, nos isolados mantidos em meio

de cultura PmTG, enquanto nos substratos celulósicos utilizados como iscas (epiderme de cebola e palha de milho), as estruturas mais abundantes foram as células intercalares, seguidas pelos esporos de resistência, e por fim pelos zoosporângios. Essa espécie foi descrita pela primeira vez para o Brasil por Karling (1945b), sobre materiais vegetais em decomposição em amostras de água e solo da Região Amazônica (Amazonas e Rondônia). Na descrição original de Nowakowskii (1876), *C. tenue* foi observado em tecidos de *Acorus calamus* L. e *Iris pseudocorus* L. O tamanho dos zoosporângios, esporos de resistência e zoósporos dos isolados do PEIC concordam com o relatado por Nowakowskii (1876), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012); no entanto, os espécimes isolados apresentam células turbinadas maiores que os descritos por (Karling 1945b) para os espécimes brasileiros, o qual cita de  $9-12 \times 6-8 \mu\text{m}$ , mas concorda com o relatado por Nascimento & Pires-Zottarelli (2009).



Figuras 63-65. *Cladochytrium replicatum* Karling. 63. Zoosporângios com tubo de liberação dos zoósporos. 64. Esporo de resistência. 65. Zoósporos. Figuras 66-68. *Cladochytrium tenue* Nowakowskii. 66. Rizomicélio com celulas intercalares. 67. Zoosporângio. 68. Esporos de resistência. Barras = 10  $\mu$ m.

***Polychytrium aggregatum*** Ajello, Mycologia 34: 442. 1942.

Figuras 69-74

Talo policêntrico, com rizomicélio extensivo, ramificado, hialino, tornando-se marrom-amarelados na maturidade. Zoosporângios inoperculados, não apofisados,

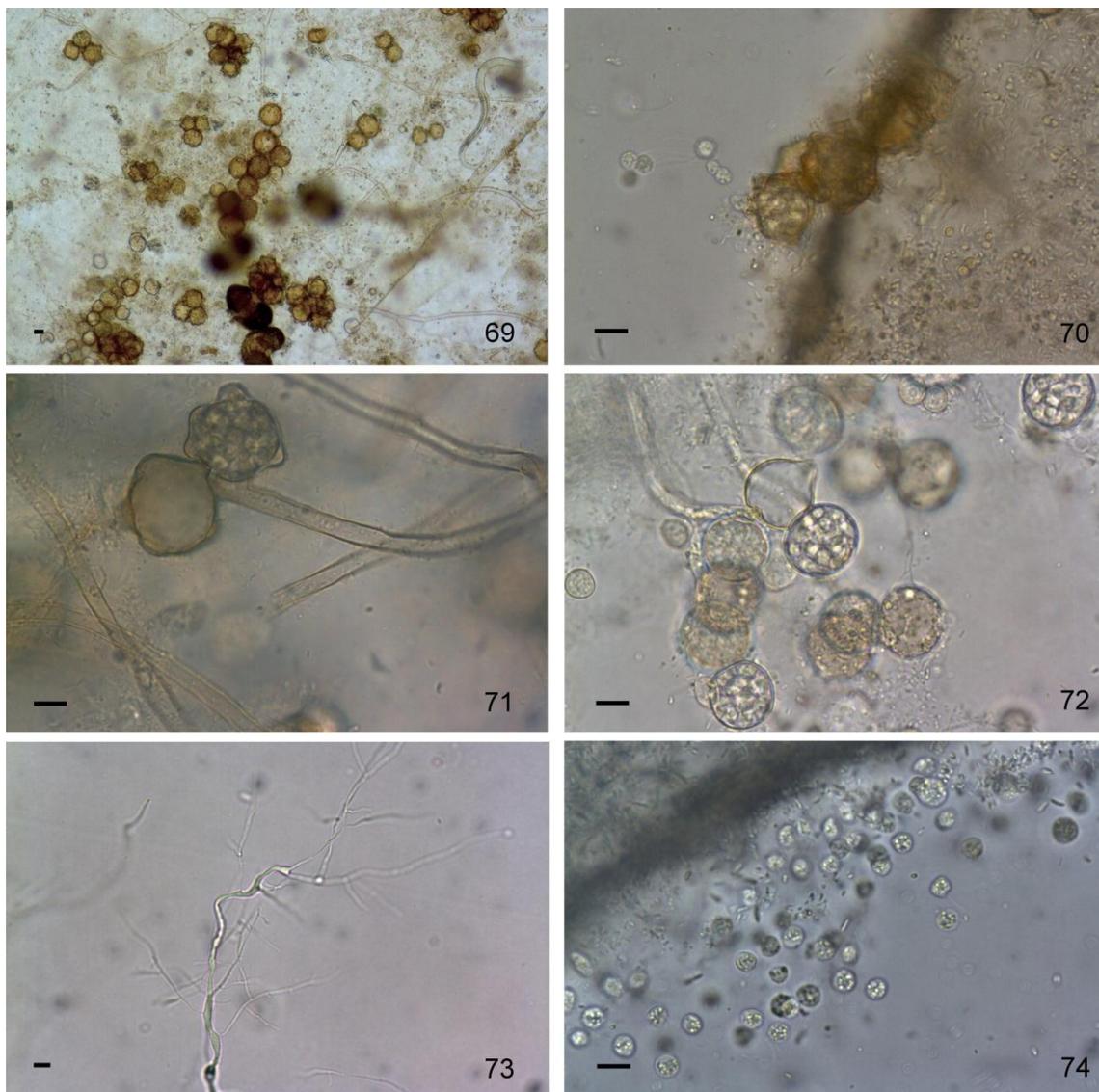
hialinos quando jovens, tornando-se marrom-amarelados na maturidade, lisos ou ornamentados, intercalares ou terminais, esféricos, 17,5-30  $\mu\text{m}$  diâm. e piriformes, 20-32,5 x 17,5-30  $\mu\text{m}$ , formando agregados de dois ou mais; ornamentações papiladas ou tuberculadas. Zoósporos esféricos 5-7  $\mu\text{m}$  diâm. com numerosas gotículas lipídicas. Estrutura de resistência não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão e ecdise de cobra, amostras de água, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 7-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2013, 05-VI-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4017, SP 445878).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Piauí, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012).

Comentários: *P. aggregatum* caracteriza-se pela produção de um talo policêntrico com zoosporângios agregados, ornamentados, inoperculados, que se tornam amarelados quando desenvolvidos. Pode ocorrer, no entanto, a formação de zoosporângios lisos de formatos e tamanhos variáveis (Ajello 1942), fato observado nos isolados examinados. Segundo Ajello (1942) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007), é possível observar a proliferação interna do zoosporângio, fato não constatado nos espécimes do PEIC. Os zoosporângios observados estão de acordo com Ajello (1942) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007); no entanto, os zoósporos dos isolados examinados, são maiores que os descritos por Ajello (1942) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007), que citam zoósporos esféricos 4,4-5,5  $\mu\text{m}$  diâm. e 5-6  $\mu\text{m}$  diâm., respectivamente. Embora Ajello (1942) tenha descrito essa espécie pela primeira vez como saprofítica em substratos vegetais em New Jersey, Estados Unidos, ela é mais comumente encontrada em substratos

quitinosos e queratinosos (Pires-Zotarelli & Gomes 2007; Nascimento & Pires-Zotarelli 2012).



Figuras 69-74. *Polychytrium aggregatum* Ajello. 69. Aspecto geral. 70. Liberação dos zoósporos. 71. Zoosporângios ornamentados. 72. Zoosporângios lisos. 73. Rizomicélio. 74. Zoósporos.

#### NOWAKOWSKIELLACEAE

*Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor, American Journal of Botany 29: 174. 1942.

## Figuras 75-77

Talo eucárpico, policêntrico, extra-intramatrical. Rizomicélio muito ramificado, extenso, hialino, apresentando dilatações fusiformes não septadas. Zoosporângios hialinos, lisos, operculados, normalmente terminais ou laterais, piriformes, 28-20 x 16-24 µm e ovais, 20-34 x 16-24 µm. Zoósporos encistados, 3 µm diâm. com uma gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência intercalares e terminais, parede lisa, alongados 17,5-22,5 x 12,5-15 µm, hemisféricos 15-20 x 12,5-15 µm e irregulares; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em celofane, epiderme de cebola e palha de milho, amostras de água, 6-XI-2012, 26-II-2013, 04-VII-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445870).

Distribuição no Brasil: **Minas Gerais, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: A principal característica de *N. hemisphaerospora* que a distingue das demais espécies do gênero é a produção de estruturas de resistência intercalares, divididas em duas porções distintas. Segundo descrição original de Shanor (1942), os zoosporângios e as estruturas de resistência surgem em várias porções intercalares do rizomicélio e em pequenas ramificações terminais. A presença destas estruturas intercalares no rizomicélio é predominante, característica observada nos isolados do PEIC. Ainda segundo a autora, as estruturas de resistência são formadas ao mesmo tempo, ou até mesmo antes dos zoosporângios e, em muitos casos, é possível observar, principalmente em talos jovens, que as estruturas de resistência estão completamente formadas, enquanto os zoosporângios ainda não atingiram a maturidade, características também observadas nos espécimes do PEIC. No início do desenvolvimento da estrutura de resistência, o conteúdo apresenta-se homogêneo e denso, e com o desenvolvimento

ocorrem simultaneamente a formação de uma parede interna, que divide esta estrutura em duas porções de tamanhos similares e a migração do conteúdo de uma das porções para o lado oposto. Essa porção preenchida formará o esporo de resistência, que segundo Shanor (1942), embora com menor frequência, podem ser observados em pares dentro da estrutura de resistência, característica não observada nos isolados do PEIC, que apresentaram somente um esporo por estrutura de resistência. Os zoosporângios são pouco maiores que os descritos por Shanor (1942), e menores que os descritos por Pires-Zottarelli & Rocha (2007), que citam respectivamente zoosporângios de 7,5-14,2 x 9,5-28,4  $\mu\text{m}$  e de 40-50 x 35-40  $\mu\text{m}$ ; no entanto, os zoósporos e esporos de resistência são similares aos descritos pelas autoras.

*Nowakowskiella multispora* Karling, Sydowia 17: 314. 1964.

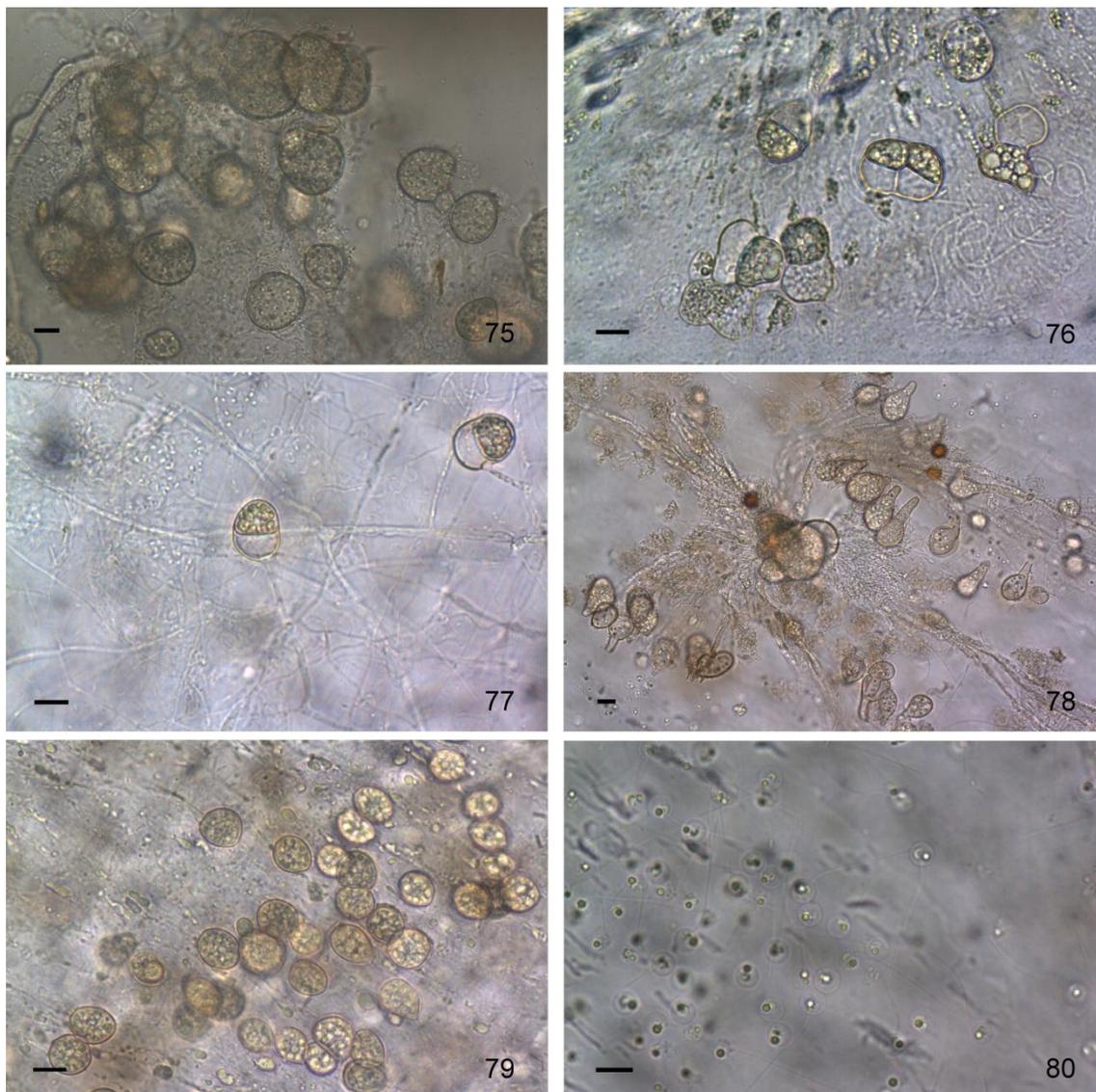
Figuras 78-80

Talo eucárpico, policêntrico, extra-intramatrical. Rizomicélio profuso e constricto com numerosas dilatações fusiformes, 8-10 x 4-7  $\mu\text{m}$ , não septadas. Zoosporângios hialinos, lisos, operculados, não apofisados, normalmente terminais, obpiriformes, 22,5-47,5 x 12,5-22,5  $\mu\text{m}$ ; ovais, 25 - 20  $\mu\text{m}$  e elípticos, 27,5-17,5  $\mu\text{m}$ . Zoósporos encistados, 5  $\mu\text{m}$  diâm., com uma pequena gotícula lipídica. Esporos de resistência abundantes, normalmente intercalares, hialinos, lisos, ovais, 12,5-17,5 x 10-12,5  $\mu\text{m}$ , alguns esféricos, 12,5-15  $\mu\text{m}$  diâm., contendo numerosos glóbulos lipídicos; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em celofane, amostras de água, 21-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 04-VII-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4015, SP 445869).

Distribuição no Brasil: **Minas Gerais, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, Jesus *et al.* 2013).

Comentários: *N. multispora* caracteriza-se pela produção abundante de esporos de resistência intercalares no rizomicélio. Karling (1964) relata a presença de zoosporângios endo e exoperculados; no entanto, somente os zoosporângios exoperculados foram observados nos espécimes analisados. Karling (1964) cita zoosporângios, esporos de resistência e zoósporos de 12-16 x 20-32  $\mu\text{m}$ , 15-30  $\mu\text{m}$  diâm. e 3-3,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente, mensurações menores que os encontrados nos isolados do PEIC, no entanto, os esporos de resistência dos isolados examinados concordam com Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012). Embora Karling (1964) aponte a primeira ocorrência desta espécie para amostras de solo do distrito de Rhamnad, Estado de Madras, Índia, todos os espécimes examinados ocorreram em água, o mesmo observado por Oliveira (2004), Pires-Zottarelli (1999), Pires-Zottarelli & Gomes (2007).



Figuras 75-77. *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor,. 75. Zoosporângios. 76-77. Esporos de resistência. Figuras 78-80. *Nowakowskiella multispora* Karling. 78. Zoosporângios. 79. Esporos de resistência. 80. Zoósporos. Barras= 10  $\mu$ m.

## RHIZOPHYDIALES

### RHIZOPHYDIACEAE

*Rhizophydium coronum* Hanson, Torrey 44: 31. 1944.

Figuras 81-82

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Rizóides extensos, ramificados, com um eixo frequentemente proeminente e muito prolongado. Zoosporângios lisos, hialinos, inoperculados, esféricos, 17,5-41,5 µm diâm. e ovais, 34-45 x 45-47 µm, com halos concêntricos em torno do zoosporângio em desenvolvimento, normalmente um na maturidade. Zoósporos encistados, 2-3 µm diâm. com uma grande gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de água, 6-XI-2012; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445890).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012).

Comentários: A principal característica de *R. coronum* é a produção de halos concêntricos em torno do zoosporângio em desenvolvimento. Segundo descrição original de Hanson (1944), durante o desenvolvimento pode ser observado a presença de vários halos que são reduzidos a normalmente um na maturidade, característica observada nos isolados do PEIC. Esta espécie foi descrita pela primeira vez para o Brasil por Booth (1979) em amostras de solo de dunas de Cananéia. O tamanho dos zoosporângios concordam com os descritos por Hanson (1944), mas são pouco maiores que os descritos por Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), que citam zoosporângios esféricos de 25-35 µm diâm. e ovais de 34-36 x 37-41 µm, respectivamente. Os zoósporos são pouco menores que os descritos por Hanson (1944), que cita entre 3,7-4,5 µm diâm.

*Rhizophydium elyense* Sparrow, Transactions of the British Mycological Society 40: 525. 1957.

Figuras 83-84

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal fino, delicado, ramificado, surgindo da base do zoosporângio com um eixo principal. Zoosporângios sésseis, hialinos, esféricos, 10-36 µm diâm. ou predominantemente angulares ou poliédricos, 12,5-27 x 10-27 µm, formado entre 2 a 5 papilas para liberação dos zoósporos; parede fina e lisa. Zoósporos esféricos de 2,5-4 µm diâm. com uma única gotícula lipídica hialina. Esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de água, 6-XI-2012; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445891).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Piauí, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012).

Comentários: A principal característica de *R. elyense* é a produção de zoosporângios sésseis, de parede delgada e formato angular na maturidade. O aspecto angulado ou poliédrico é resultado da formação de inúmeras papilas, por meio das quais ocorre a liberação dos zoósporos. A descrição original de Sparrow (1957) não apresenta nenhuma discussão comparativa entre *R. elyense* (denominado originalmente como *R. elyensis*) e outras espécies do gênero. Os zoosporângios dos isolados do PEIC concordam com as descrições de Sparrow (1957), Rocha & Pires-Zottarelli (2002), Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012). Os zoósporos são menores que os descritos por Rocha & Pires-Zottarelli (2002), que citam zoósporos esféricos de 7,5 µm diâm. Esporos de resistência não foram observados, o mesmo ocorrendo nas descrições de Sparrow (1957), Rocha & Pires-Zottarelli (2002), Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012). Essa espécie ocorreu abundantemente em ecdise de cobra utilizada como isca e foi citada

pela primeira vez para o Brasil por Pires-Zottarelli & Milanez (1993) em amostras de água e solo, crescendo em substratos queratinosos (ecdise de cobra), celulósicos (epiderme de cebola) e grãos de pólen de *Pinus* sp. na Represa do Lobo (“Broa”) localizada em São Carlos (SP).

## MONOBLEPHARIDOMYCETES

### MONOBLEPHARIDALES

#### GONAPODYACEAE

*Gonapodya prolifera* (Cornu) Fischer, Rabenhorst Kryptogamenflora 1: 382. 1892.

Basiônimo: *Monoblepharis prolifera* Cornu, Bulletin de la Societé Botanique de France 24: 226. 1877.

Figuras 85-86

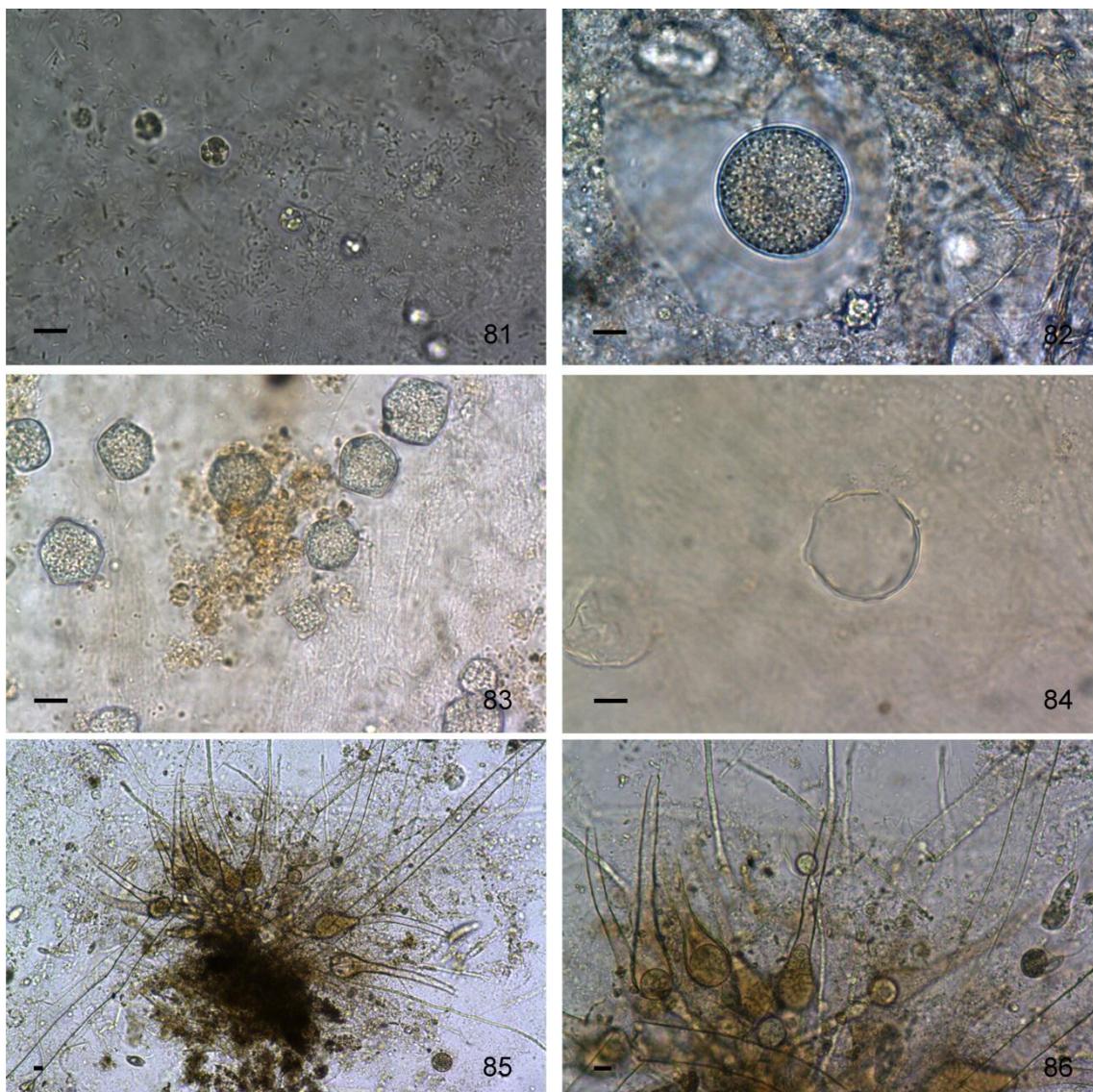
Micélio com hifas divididas por pseudoseptos, formando segmentos clavados. Zoosporângios obclavados 70-175 x 17,5-30 µm, com proliferações internas, base inflada, porção distal alongada e afunilada. Produção de zoósporos, gametângios e zigoto não observadas.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em graveto submerso, amostras de água, 04-VII-2013; *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445897).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Minas Gerais, Piauí, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012).

Comentários: As principais características de *G. prolifera* são a produção de hifas regulares com pseudoseptos, os quais formam segmentos clavados e zoosporângios elíptico-alongados com proliferações internas. O tamanho dos zoosporângios dos

isolados examinados são maiores que os descritos por Rocha (2002) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007) que citam respectivamente, 16-82 x 12-33  $\mu\text{m}$  e 62,5-115 x 20-27,5  $\mu\text{m}$ , mas concordam com Karling (1977).



Figuras 81-82. *Rhizophydium coronum* Hanson. 81. Início do desenvolvimento. 82. Zoosporângio com halos concêntricos. Figuras 83-84. *Rhizophydium elyense* Sparrow. 83. Zoosporângios. 84. Zoosporângio vazio com 3 poros de liberação. 85-86. *Gonapodya prolifera* (Cornu) Fischer. 85. Aspecto geral do talo. 86. Zoosporângios.

### Ocorrência e distribuição dos táxons identificados nos locais amostrados

*Cladochytrium replicatum* (16,7%), *C. tenue* (11,7%), *Chytrium spinosus* (11,7%) e *Nowakowskiella multispora* (11,7%) foram os táxons que apresentaram, respectivamente, os maiores valores de frequência e amplitude de distribuição nos locais amostrados (Tabela 3). A ampla distribuição destes táxons indica que eles provavelmente possuem mecanismos adaptativos (fisiológicos e/ou estruturais) que os possibilitam ocorrer em locais com diferentes características abióticas. Três destas espécies apresentaram a produção de grande quantidade de esporos de resistência, estrutura que segundo Gleason *et al.* (2010) permitem que tolerem condições adversas (variações de temperatura, umidade e pH) e sobrevivam em ambientes aparentemente desfavoráveis. Segundo os mesmos autores, a presença de espécies ornamentadas em pH mais ácidos sugere algum tipo de relação ainda desconhecida, como apontado por Joyce E. Longcore (comunicação pessoal para Carmen L. A. Pires-Zottarelli), fato observado neste estudo com as espécies *Cytrium spinosus* e *Phlyctochytrium aureliae*. Dentre os locais amostrados de água doce, A8 foi o que demonstrou maior representatividade quanto ao número de táxons e ocorrências, com 9 táxons identificados e 11 ocorrências dos mesmos, sendo as espécies *Diplophlyctis complicata* e *Entophlyctis lobata*, encontradas somente nesta localidade. Localizado na porção inferior do Rio Perequê, A8 forma um poço de águas pouco turbulentas, margeado por Floresta Ombrófila densa.

Tabela 3. Ocorrência e distribuição dos táxons nos diferentes locais de coleta de água no PEIC durante o período amostrado. A1 a A15 representam os locais amostrados. F (%)= Frequência.

Táxons/Locais	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	F(%)
REINO FUNGI																
FILO BLASTOCLADIOMYCOTA																
BLASTOCLADIOMYCETES																
BLASTOCLADIALES																
CATENARIACEAE																
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling		1	2					1			2					6,7
FILO CHYTRIDIOMYCOTA																
CHYTRIDIOMYCETES																
CHYTRIDIALES																
CHYTRIDIACEAE																
<i>Chytrium appendiculatus</i> Karling			3		1		3	1			1				2	10
<i>C. hyalinus</i> Karling				1	1	1										5
<i>C. spinosus</i> Fay	1		3						1	2		3	4	2		11,7
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello	1								1							3,3
<i>P. furcatum</i> Sparrow										1						1,7
<i>Karlingiomyces dubius</i> Karling (Sparrow)	1															1,7
<i>K. granulatus</i> Karling (Sparrow)										1						1,7

Táxons/Locais	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	F(%)
<i>Karlingiomyces</i> sp.										1						1,7
ENDOCHYTRIACEAE																
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma														1	1	3,3
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma								1								1,7
<i>D. intestina</i> (Schenk) Schröter			1	1			1				1					6,7
<i>D. sarcoptoides</i> (H.E. Petersen) Dogma								1	1							3,3
<i>Entophlyctis luteolus</i> Longcore					1					1						3,3
<i>E. lobata</i> Willoughby & Towley								1								1,7
CLADOCHYTRIALES																
CLADOCHYTRIACEAE																
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	1	1	3	2	2		2	3	1	1					3	16,7
<i>C. tenue</i> Nowakowski	1							1	1	3		2	2	1		11,7
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello									1	2	1	2	3	1		10
INCERTAE SEDIS																
<i>Catenochytridium</i> sp.									1							1,7
NOWAKOWSKIELLACEAE																
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i> Shanor	1				2		1	1								6,7
<i>N. multispora</i> Karling	1		1	1	1	1	3	1								11,7
RHIZOPHYDIALES																
RHIZOPHYDIACEAE																

<b>Táxons/Locais</b>	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	F(%)
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson				1												1,7
<i>R. elyense</i> Sparrow							1									1,7
<b>MONOBLEPHARIDOMYCETES</b>																
<b>MONOBLEPHARIDALES</b>																
<b>GONAPODYACEAE</b>																
<i>Gonapodya prolifera</i> (Cornu) Fischer.				1												1,7
<b>Total de táxons</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	
<b>Total de ocorrências</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	

### **Preferência dos táxons identificados por tipo de substrato (isca)**

A importância dos substratos na taxonomia destes fungos foi demonstrada por Sparrow (1960) e Barr (2001). Sparrow (1960) forneceu uma longa lista de substratos nos quais esses organismos se desenvolvem e Barr (2001) salientou a plasticidade morfológica desses fungos em diferentes tipos de substratos e a capacidade de determinadas espécies, como *Rhizophydium sphaeocarpum*, de atuar como sapróbia e parasita. A ocorrência de cada um dos táxons nos substratos utilizados como iscas (Tabela 4) evidencia que a maioria deles (65,6%) ocorreu em substratos celulósicos, seguidos por substrato quitinoso (21,9%) e queratinosos (12,5%). Esses dados numéricos provavelmente são reflexo da maior oferta de substratos celulósicos em relação aos demais substratos. No entanto, Haskins (1939) e Gleason *et al.* (2010), afirmam que a maioria dos fungos zoospóricos são capazes de decompor substratos celulósicos, como frutos, gravetos, raízes e folhas. Entre os substratos celulósicos, a epiderme de cebola foi a mais eficiente, responsável por 34,4 % das ocorrências, seguida pela palha de milho (21,9%). Membros dos gêneros *Cladochytrium* e *Nowakowskiella* foram os predominantes nos substratos celulósicos, responsáveis por 27% das ocorrências em epiderme de cebola, 29% em palha de milho e 100% em celofane. Em especial, *Nowakowskiella hemisphaerospora* foi encontrada nos três diferentes substratos celulósicos fornecidos como iscas, demonstrando a grande capacidade de degradar substratos desta natureza. De acordo com Barr (2001), a utilização de fontes complexas de celulose favorece a ocorrência de determinados táxons com grande capacidade enzimática, como membros de *Nowakowskiella* e *Cladochytrium*. O cabelo loiro de criança e o grão de pólen foram as iscas menos eficientes durante a iscagem, com somente uma ocorrência em grãos de pólen (3,1%) e nenhuma em cabelo. A grande maioria dos táxons (79,2%) ocorreu em apenas um tipo

de substrato, evidenciando preferência, no entanto, *Phlyctochytrium aureliae* e *Polychytrium aggregatum* ocorreram em mais de um tipo, provavelmente devido ao aparato enzimático destas espécies.

Tabela 4. Ocorrência dos táxons nos diferentes tipos de substratos utilizados como iscas nas amostras de água doce, durante o período de estudo. \*ocorrência em larvas de *Odonata*; \*\* ocorrência em graveto submerso.

Táxons/Iscas	Epiderme de cebola	Palha de milho	Celofane	Grão de Pólen	Exoesqueleto de camarão	Cabelo loiro	Ecdise de cobra
REINO FUNGI							
FILO							
BLASTOCLADIOMYCOTA							
BLASTOCLADIOMYCETES							
BLASTOCLADIALES							
CATENARIACEAE							
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling							1
FILO CHYTRIDIOMYCOTA							
CHYTRIDIOMYCETES							
CHYTRIDIALES							
CHYTRIDIACEAE							
<i>Chytrium appendiculatus</i> Karling					1		
<i>C. hyalinus</i> Karling					1		
<i>C. spinosus</i> Fay	1	1					
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello	1	1		1			
<i>P. furcatum</i> Sparrow	1						
<i>Karlingiomyces dubius</i> Karling (Sparrow)					1		
<i>K. granulatus</i> Karling (Sparrow)	1	1					
<i>Karlingiomyces</i> sp	1						
ENDOCHYTRIAACEAE							
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma					1		
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma					1		
<i>D. intestina</i> (Schenk) Schröter	1						
<i>D. sarcoptoides</i> (H.E. Petersen) Dogma					1		
<i>Entophlyctis luteolus</i> Longcore	1	1					
<i>E. lobata</i> Willoughby & Towley*							
CLADOCHYTRIALES							
CLADOCHYTRIAACEAE							
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	1	1					
<i>C. tenue</i> Nowakowski	1						
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello					1		1
INCERTAE SEDIS							
<i>Catenochytridium</i> sp	1	1					

Táxons/Isclas	Epiderme de cebola	Palha de milho	Celofane	Grão de Pólen	Exoesqueleto de camarão	Cabelo loiro	Ecdise de cobra
NOWAKOWSKIELLACEAE							
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i> Shanor	1	1	1				
<i>N. multispora</i> Karling			1				
RHIZOPHYDIALES							
RHIZOPHYDIACEAE							
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson							1
<i>R. elyense</i> Sparrow							1
MONOBLEPHARIDOMYCETES							
MONOBLEPHARIDALES							
GONAPODYACEAE							
<i>Gonapodya prolifera</i> (Cornu) Fisch.er**							
<b>Total de ocorrências</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>4</b>

Os resultados obtidos neste estudo contribuem de modo significativo para o conhecimento da micota local, já que todos os táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota são primeiras ocorrências para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso, e ampliam o conhecimento destes grupos de fungos zoospóricos em áreas de Mata Atlântica no Estado de São Paulo e no Brasil. Além disso, mesmo diante da dificuldade de isolamento e cultivo destes fungos, já citada em literatura, foi possível obter culturas puras de *Polychytrium aggregatum*, *Cladochytrium tenue*, *C. replicatum* e *Nowakowskiella multispora*, a partir de diferentes amostras de água doce, o que permitirá outros estudos com estas espécies.

### Referências bibliográficas

- Ab'Saber, A.N.** 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. Geomorfologia 52: 1-21.
- Ajello, L.** 1942. *Polychytrium*: A new cladochytriaceous genus. Mycologia 34: 442-451.

- Ajello, L.** 1945. *Phlyctochytrium aureliae* parasitized by *Rhizophydium chytriophagum*. Mycologia 37: 109-119.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M.** 1996. Introductory Mycology. 4 ed. New York: John Wiley, Sons, Inc.
- Antikajian, G.** 1949. A developmental, morphological and cytological study of *Asterophlyctis* with special reference to its sexuality, taxonomy, and relationships. American Journal of Botany 36: 245-262.
- Barros, F., Melo, M.M.R.F., Chiea, S.A.C., Kirizawa, M. et al.** 1991. Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso. Boletim do Instituto de Botânica pp. 1-184.
- Barr, D. J. S.** 2001. Chytridiomycota. In McLaughlin, D. J., E. G. McLaughlin & P. A. Lemke (eds), The Mycota. Springer-Verlag, New York, NY, pp. 93–112.
- Beneke, E.S. & Rogers, L.** 1962. Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Paraná, Brazil. Rickia 1: 181-193.
- Beneke, E.S. & Rogers, A.L.** 1970. Aquatic fungi of Parque Nacional do Itatiaia in the state of Rio de Janeiro. Rickia 5: 51-64.
- Blackwell, W.H., Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2004. Synopsis and systematics reconsideration of *Karlingiomyces* (Chytridiomycota). Mycotaxon 89: 259-276.
- Booth, T.** 1979. Strategies for study of fungi marine and marine influenced ecosystems. Revista de Microbiologia 10: 123-138.
- Cornu, M.** 1877. Remarques sur quelques Saprolegniées nouvelles. Bulletin de la Société Botanique de France 24: 226.
- Dogma Jr, I.J.** 1973. Developmental and taxonomic studies on rhizophlyctoid fungi, Chytridiales. I. Dehiscence mechanisms and generic concepts. Nowa Hedwigia 24: 393-411.

- Dogma Jr, I.J.** 1974a. Developmental and taxonomic studies on rhizophlyctoid fungi, Chytridiales. IV. *Karlingia granulata*, *Karlingia spinosa*, and *Karlingiomyces dubius*. Nova Hedwigia 25: 91-105.
- Dogma Jr, I.J.** 1974b. Studies on chytinophylic *Siphonaria*, *Diplophlyctis* and *Rhizoclostridium*, Chytriales. III. *Nephochytrium complicatus* Willoughby: another *Diplophlyctis* with a sexual phase. Nova Hedwigia 25: 143-159.
- Dogma Jr, I.J.** 1976. Studies on chitinophilic *Siphonaria*, *Diplophlyctis* and *Rhizoclostridium*, Chytridiales. V. *Diplophlyctis asteroidea*, a new species with resting spores. Transactions of the British Mycological Society 67: 255-264.
- Fay, D.J.** 1947. *Chytrium spinosus* nov.sp. Mycologia 39: 152-157.
- Fisher A.** 1892. Phycomycetes. Die Pilze Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz. Rabenhorst Kryptogamen 1: 490.
- Funari F. L., Struffaldi-De-Vuono Y. & Salum S. T.** 1987. Balanço hídrico de duas áreas de Mata Atlântica: Reserva Biológica de Paranapiacaba e Parque Estadual da Ilha do Cardoso (Estado de São Paulo). In: Anais do 6º Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo, (Pereira M.F.A., Masei M.A.S. eds.). Sociedade Botânica de São Paulo, Campinas.
- Gleason, F.H., Daynes, C.N. & McGee, P.A.** 2010. Some zoosporic fungi can grow and survive within a wide pH range. Fungal Ecology 3: 31–37.
- Hanson, A.M.** 1944. Three new saprofitic chytrids. Torreyia 44: 30-34.
- Hanson, A.M.** 1946. A morphological, developmental and cytological study of four saprophytic chytrids IV. *Phlyctorhiza endogena* gen. nov., sp. nov. American Journal of Botany 33: 732-739.
- Haskins, R. H.** 1939. Cellulose as a substratum for saprophytic chytrids. American Journal of Botany 26: 635-639.

- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E. et al.** 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota): description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98: 860-871.
- Jesus, A.L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40: 167-180.
- Kagami, M., E. Van Donk, A. de Bruin, M. Rijkeboer & B. W. Ibelings,** 2004. *Daphnia* can protect diatoms from fungal parasitism. *Limnology and Oceanography* 49: 680-685.
- Karling, J.S.** 1931. Studies in the Chytridiales VI. The occurrence and life history of a new species of *Cladochytrium* in cells of *Eriocaulon septangulare*. *American Journal of Botany* 18: 526-557.
- Karling, J.S.** 1945a. Brazilian chytrids. VI. *Rhopalophlyctis* and *Chytriomycetes*, two new chitinophilic operculate genera. *American Journal of Botany* 32: 362-369.
- Karling, J.S.** 1945b. Brazilian chytrids. V. *Nowakowskiella macrospora* n. sp. and other polycentric species. *American Journal of Botany* 32: 29-35.
- Karling, J.S.** 1946. Keratinophilic chytrids. *American Journal of Botany* 33: 219.
- Karling, J.S.** 1947a. Keratinophilic chytrids. II. *Phlyctorhiza variabilis* n. sp. *American Journal of Botany* 34: 27-32.
- Karling, J.S.** 1947b. New species of *Chytriomycetes*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 74: 334-344.
- Karling, J.S.** 1947c. Brazilian chytrids. X. New species with sunken opercula. *Mycologia* 39: 56-70.

- Karling, J.S.** 1949. New monocentric eucarpic operculate chytrids from Maryland. 41: 505-522.
- Karling, J.S.** 1951. Polycentric strains of *Plyctorhiza*. American Journal of Botany 38: 772-777.
- Karling, J.S.** 1964. Indian Chytrids. IV. *Nowakowskiella multispora* sp. nov. and other polycentric species. Sydowia 17: 314-319.
- Karling, J.S.** 1965. *Catenophlyctis*, a new genus of the Catenariaceae. American Journal of Botany 52: 133-138.
- Karling, J. S.** 1977. Chytridiomycetorum Iconographia. Lubrecht & Cramer, Vaduz.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter D.W. & Stalpers, J.A.** 2008. Dictionary of fungi. 10<sup>a</sup> ed. CABI Publishing, United Kingdom.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2002. Taxonomic summary of *Chytriomycetes* (Chytridiomycota). Mycotaxon 84: 447-487.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2005. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). Nova Hedwigia 80: 115-133.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Churchill, P.F. & Chambers, J.G.** 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order *Rhizophydiales* (Chytridiomycota). Mycological Research 110: 898-915.
- Letcher, P.M., Velez, C.G., Barrantes, M.E., Powell, M.J. et al.** 2008. Ultrastructural and molecular analyses of *Rhizophydiales* (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. Mycological Research 112: 759-782.
- Longcore, J.E.,** 1995. Morphology and zoospore ultrastructure of *Entophlyctis luteolus* sp. nov. (Chytridiales): Implications for chytrid taxonomy. Mycologia 87: 25-33.

- Longcore, J.E. & Simmons, R.D.** 2012. The Polychytriales ord. nov. contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. *Mycologia* 104: 276-294.
- Marano, A.V., Barrera, M.D., Steciow, M.M., Donadelli, J.L., et al.** 2008. Frequency, abundance and distribution of zoosporic organisms from Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina). *Mycologia* 100: 691-700.
- Marano, A.V., Pires-Zottarelli, C.L.A., Barrera, M.D., Steciow, M.M. et al.** 2011. Diversity, role in decomposition, and succession of zoosporic fungi and straminipiles and submerged decaying leaves in a woodland stream. *Hydrobiologia* 659: 93-109.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. *In:* O. Fidalgo, V.L. Bononi (coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série Documentos. São Paulo, Instituto de Botânica. pp. 17-20.
- Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Brazilian zoosporic fungi. 112p.
- Mozley-Standridge, S.E., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Porter, D. et al.** 2009. Cladochytridiales - a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research*. 113: 498-507.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2009. Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23: 459-473.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2010. Blastocladales e Spizellomycetales do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 693-704.

- Nascimento, C.A., Gomes, E.P.C. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2011. Occurrence and distribution of zoosporic organisms in water bodies from Brazilian Cerrado. *Mycologia* 103: 261-272.
- Nascimento, C.A., Gomes, E.P.C., de Souza, J.I. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2012. Zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles assembles from soil of Brazilian Cerrado areas. *Fungal Ecology* 5: 114-123.
- Nowakowskii, L.** 1877. Beitrag zur Kenntniss der Chytridiaceen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2: 73-100.
- Petersen, M.H.E.** 1903. Observés dans les téguments vides des nymphes de Phryganées, avec description de trois especies nouvelles de Chytridinées. *Journal de Botanique* 17: 214-222.
- Pires-Zottarelli, C.L.A., Milanez, A.I., Schoenlein-Crusius, I.H. & Lohmann, L.G.** 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 6: Chytridiales. *Hoehnea* 23: 77-90.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1999. Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, São Paulo, SP, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- Pires-Zottarelli, C.L.A., Gomes, A.L. & Nascimento, C.A.** 2007. *Entophlyctis luteolus* in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Mycotaxon* 99: 207-210.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* 7: 309-329.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Rocha, M.** 2007. Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 21: 125-136.

- Powell, M.J.** 1993. Looking at mycology with a Janus face: a glimpse at Chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia* 85: 1 – 20.
- Rocha, J.R.S.** 2002. Fungos zoospóricos em áreas de Cerrado no Parque Nacional das Sete cidades, Piauí, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Rocha, M.** 2004. Micota zoospórica de lagos com diferentes trófitas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Rogers, A.L., Milanez, A.I. & Beneke, E.S.** 1970. Additional aquatic fungi from São Paulo State. *Rickia* 5: 93-110.
- Rothwell, F.M.** 1956. Nutritional requirements of *Phlyctorhiza variabilis*. *American Journal of Botany* 43: 28-32.
- Shanor, L.** 1942. A new fungus belonging to the Cladochytriaceae. *American Journal of Botany*: 29: 174-179.
- Schenk, A.** 1858. Algologische Mittheilungen. *Phys.- Med Gesell Würzburg*. 8: 235-259.
- Schoenlein-Crusius, I.H. & Milanez, A.I.** 1998. Fungos zoospóricos (Mastigomycotina) da mata atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, município de Santo André, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 177-181.
- Schröter, J.** 1892. *In* Engler and Prantl, *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 1:78.
- Schoenlein-Crusius, I.H., Milanez, A.I., Trufem, S.F.B., Pires-Zottarelli, C.L.A. et al.** 2006. Microscopic Fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 267-275.

- Shearer, C.A., Langsam, D.M & Longcore, J.E.** 2004. Fungi in freshwater habitats. Biodiversity of Fungi *In*: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.). Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J. et al.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation* 16: 49-67.
- Simmons, D.R., James, T.Y., Meyer, A.F. & Longcore, J.E.** 2009. Lobulomycetales, a new order in the Chytridiomycota. *Mycological Research* 113: 450-460.
- Sparrow, F.K.** 1942. A classification of aquatic Phycomycetes. *Mycologia* 34: 113-116.
- Sparrow, F.K.** 1957. A further contribution to the Phycomycete Flora of Great Britain. *Transactions British of the Mycological Society* 40: 523-535.
- Sparrow, F.K.** 1960. Aquatic Phycomycetes. University of Michigan Press. 2<sup>a</sup> ed. Ann Arbor.
- Sparrow, F.K.** 1966. A new bog chytrid. *Archiv für Mikrobiologie* 3: 178-180.
- Steciow, M.M., Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A., Marano, A.V. et al.** 2012. Zoosporic True Fungi, Heterotrophic Stramenipiles and Plasmodiophorids: Status of knowledge in South America. *Darwiniana* 50: 25-32.
- Taylor, T.N., Remy, W., & Hass, H.** 1992. Fungi from Lower Devonian Rhynic chert: Chytridiomycetes. *American Journal of Botany* 79: 1233-1241.
- Ulken, A.** 1970. Phycomyceten aus der Mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). *Veröffentlichungen des Institus fur Meeresforschung in Bremerhaven* 12: 313-319.
- Ulken, A.** 1972. Physiological studies on a Phycomycete from the Mangrove swamp at Cananéia, São Paulo, Brazil. *Veröffentlichungen des Instituts fur Meeresforschung in Bremerhaven* 13: 217-230.

- Wakefield, W.S., Powell, M.J., Letcher, P.M., Barr, D.J.S., Churchill, P.F. et al.** 2010. A molecular phylogenetic evaluation of the Spizellomycetales. *Mycologia* 102: 596-604.
- Willoughby, L.G.** 1957. Studies on soil chytrids II. On *Karlingia dubia* Karling. Transactions of the British Mycological Society 40: 9-16.
- Willoughby, L.G. & Towley, P.J.** 1961. Two new saprofitic chytrids from the Lake District. Transactions of the British Mycological Society 44: 177-184.
- Willoughby, L.G.** 1962. New species of *Nephrochytrium* from the English Lake District. *Nova Hedwidia* 3: 439-444.
- Zak, J.C. & Willig, M.R.** 2004. Fungal biodiversity patterns *In*: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.). Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 59–75.

## **Capítulo II**

# **Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota de solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo**

**RESUMO** – (Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota de solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo). Para estudo da diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota presentes no solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), quatro coletas foram realizadas, de Agosto/2012 a Junho/2013. Em laboratório, alíquotas das amostras, coletadas em 15 locais, foram transferidas para placas de petri esterilizadas e os fungos isolados por meio do método de iscagem múltipla com diferentes tipos de substratos. Das 60 amostras analisadas, vinte e cinco táxons foram identificados, 22 pertencentes ao filo Chytridiomycota e três ao Blastocladiomycota. Os valores dos índices de diversidade Shannon ( $H' = 2,90$ ), dominância de Simpson ( $D = 0,07$ ) e Equitatividade ( $E = 0,70$ ) são indicativos de uma micota bastante diversa e com poucos táxons dominantes. *Chytriomycetes lucidus* Karling é citado pela primeira vez para o Brasil e *Phlyctochytrium mucronatum* Canter para o Estado de São Paulo.

Palavras-chave: biodiversidade, fungos zoospóricos, Mata Atlântica

**ABSTRACT** – (Diversity of Blastocladiomycota and Chytridiomycota from soil samples of the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso”, Cananéia municipality, São Paulo State). To study the diversity of Blastocladiomycota and Chytridiomycota from soil in the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)” located at Cananéia municipality, São Paulo State, four sampling were conducted, from August 2012 to June 2013. In the laboratory, the samples from 15 sites were transferred to sterile petri dishes and the fungi baited using the multiple baiting technique with different kinds of substrates. From 60 soil samples were identified twenty-five taxa, 22 of them belonging to Chytridiomycota and three to Blastocladiomycota. The values of Shannon diversity ( $H' = 2.90$ ), Simpson dominance ( $D = 0.07$ ) and Evenness ( $E = 0.70$ ) are indicative of a

diverse mycota with few taxa dominant. *Chytrium lucidus* Karling is first cited for Brazil and *Phlyctochytrium mucronatum* Canter for São Paulo State.

Key words: Atlantic Rainforest, biodiversity, zoosporic fungi

## Introdução

Os fungos zoospóricos dos Filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota têm sido frequentemente observados crescendo como sapróbios e/ou parasitas em diferentes tipos de substratos e hospedeiros, em ambientes terrestres e aquáticos (Sparrow 1960). Estes grupos ocupam a posição basal na árvore filogenética dos fungos e possuem como característica sinapomórfica a produção de esporos com um único flagelo liso posteriormente inserido (Shearer *et al.* 2007). Diferenciam-se pelos aspectos ultraestruturais dos zoósporos, sequências gênicas e presença de meiose espórica com alternância de gerações em Blastocladiomycota (Blackwell 2010).

Esses fungos estão amplamente distribuídos nos mais diferentes tipos de solos, das regiões árticas às tropicais, e podem ser abundantemente encontrados quando métodos apropriados são utilizados para detectá-los (Sparrow 1960), sendo sua distribuição sensivelmente afetada por diversos fatores abióticos como umidade, temperatura, pH e teor de íons (Bills *et al.* 2004). Algumas adaptações morfológicas, como paredes impermeáveis a água e produção de estruturas de resistência, como observado frequentemente em espécies de *Allomyces* e *Blastocladiella* (Gleason *et al.* 2004), podem ser de crucial importância para a sua sobrevivência em períodos de grandes flutuações climáticas.

Segundo o último dicionário de fungos (Kirk *et al.* 2008), já foram descritas 885 espécies desses filios para o mundo, sendo reportadas no Brasil 139 (15,7 % do conhecimento global), 18 pertencentes ao filo Blastocladiomycota e 121 ao Chytridiomycota, com a maior parte isolada de regiões de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Steciow *et al.* 2012). Estudos recentes (Pires-Zottarelli & Gomes 2007; Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2010), conduzidos neste bioma, apontam a ocorrência de novas citações para o país, demonstrando deste modo, o ainda escasso

conhecimento existente e a necessidade da continuidade e aprofundamento dos estudos com estes fungos. Isso é, em parte, reflexo do pequeno número de especialistas e as dificuldades encontradas no isolamento, identificação, cultivo e manutenção destes organismos (Letcher & Powell 2005).

Embora nos últimos 40 anos a maioria dos estudos tenham sido conduzidos em áreas de Mata Atlântica (Beneke & Rogers 1962, 1970, Rogers *et al.* 1970, Pires-Zottarelli *et al.* 1996, Schoenlein-Crusius & Milanez 1998, Pires-Zottarelli 1999, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2010, entre outros), não existiam estudos sobre a diversidade destes filos em solo no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), o qual agrupa diferentes tipos vegetacionais e que ainda constitui fragmento preservado de Mata Atlântica. Os únicos estudos realizados com a micota zoospórica no município de Cananéia estão restritos aos ecossistemas marinhos e solos de dunas, estando resumidos em apenas três artigos publicados na década de 70 (Ulken 1970, 1972, Booth 1979).

Estudos moleculares ambientais têm evidenciado que a composição da comunidade fúngica em solo é frequentemente composta por representantes de Basidiomycota e Ascomycota, sendo Chytridiomycota *sensu lato* reportados mais raramente, e por isso considerados de pouca importância para a manutenção e funcionamento dos ecossistemas terrestres (Freeman *et al.* 2009). A afirmação destes autores reflete o ainda escasso conhecimento da diversidade, e principalmente da ecologia destes fungos, não representando necessariamente sua menor importância nos processos de transferência de energia na cadeia alimentar. Diante disso, o objetivo deste estudo foi analisar e comparar a riqueza e a diversidade dos representantes dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota em solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso,

a fim de se evidenciar a sua ocorrência e distribuição, contribuindo para a ampliação do conhecimento e corroborando a importância destes grupos.

## **Material e Métodos**

**Área de estudo** - O Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) localiza-se no município de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo, entre os paralelos 25°03'05'' e 25°18'18''S e os meridianos 47°53'48'' e 48°05'42''W. Possui cerca de 22.500 ha, nos quais se encontram distribuídos diversos tipos de formações vegetais da Costa Atlântica Brasileira (Barros *et al.* 1991). Ocupado em grande parte por um maciço montanhoso contínuo, com cerca de 800 metros de altitude nas porções mais elevadas, a ilha apresenta relevo acidentado com formação de inúmeros cursos d'água encachoeirados, dos quais surgem diversos afluentes (Barros *et al.* 1991).

Apesar de a região possuir um clima tropical, o mesmo não se mostra homogêneo, devido à ação conjunta de diversos fatores locais como grandes variações de altitude, diferentes tipos de vegetação e influência do mar (Negreiros *et al.* 1974). Segundo a classificação de Köppen, o clima da ilha é do tipo Cfa, mesotérmico úmido, sem estação seca definida. A presença de diversos tipos de formações vegetais, influenciam diretamente os fatores edáficos do solo, afetando deste modo o teor de umidade, íons, pH, nutrientes dissolvidos, temperatura, entre outros fatores, possibilitando a amostragem de diferentes localidades muito peculiares entre si.

**Metodologia de coleta, iscagem, isolamento, purificação, identificação e preservação dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota** - Foram realizadas quatro amostragens (Agosto e Novembro de 2012 e Fevereiro e Junho de 2013), no Núcleo Perequê, localizado na porção nordeste do PEIC, local onde ocorrem

todas as variedades de fitofisionomias vegetais existentes no parque. Amostras de solo de 15 locais adjacentes aos corpos d'água (Figuras 1-6), representando solos de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Restinga, foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos, tendo sido mensurada em campo a temperatura do solo (°C), por meio de termômetro Multi Digital, a 15 cm de profundidade. Em laboratório foi determinada a umidade (%) com auxílio de um determinador de umidade da Marte ID50, bem como, o pH em H<sub>2</sub>O destilada, utilizando-se o pHmetro pHep<sup>®</sup> 3 da Hanna instrumentos. Alíquotas das amostras (15g de solo dissolvidos em 30 mL de água destilada autoclavada) foram transferidas para placas-de-petri, juntamente com substratos de origem animal e vegetal coletados no solo dos locais amostrados, e submetidas à técnica de iscagem múltipla descrita em Milanez (1989), que consiste na adição de substratos celulósicos (celofane, epiderme de cebola, palha de milho e semente de *Sorghum* sp), queratinosos (ecdise de cobra e cabelo loiro de criança) e quitinoso (exoesqueleto de camarão), bem como, grãos de pólen de *Pinus* sp. Com exceção dos grãos de pólen, cabelo loiro de criança e semente de *Sorghum* sp, as demais iscas foram padronizadas em 1 cm de diâmetro e dois fragmentos de cada isca por amostra. Essas placas foram mantidas em laboratório, com temperatura controlada de aproximadamente 21°C, e após uma semana as iscas foram observadas e os espécimes de fungos zoospóricos isolados em novas iscas e/ou meios de cultura específicos (PmTG – 0,4 g/L de leite peptonizado, 0,4 g/L de triptona e 10 g/L de Agar; mPmTG - 0,2 g/L de leite peptonizado, 0,2 g/L de triptona e 10 g/L de ágar) (Longcore 1995) e/ou MP<sub>5</sub> (4 g/L de maltose, 1 g/L de peptona, 15 g/L de ágar) (Beneke & Rogers 1962), com adição de 200mg/L de sulfato de estreptomicina e penicilina G Os táxons do gênero *Allomyces* foram isolados mediante secagem das amostras de solo em estufa a 40°C, com posterior reidratação e adição de sementes de *Sorghum* sp. Os espécimes

isolados foram identificados com auxílio dos trabalhos monográficos de Sparrow (1960) e Karling (1977), bem como, das descrições originais, e preservados em tubos de vidro com meio de cultura (PmTG), sendo então incorporados na Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt). Para os que não cresceram nos meios de cultura testados, foram preparadas lâminas semipermanentes com lactofenol e azul de algodão, as quais foram incorporadas ao Herbário do Instituto de Botânica (SP). Todas as espécies identificadas foram documentadas por meio de fotografias realizadas em equipamento de captura de imagem Leica Qwin V3.

A frequência (%) dos táxons identificados no solo foi calculada mediante a contagem dos números de unidades amostrais colonizadas pelo táxon/número de unidades amostrais examinadas x 100, onde cada local de coleta foi considerado uma unidade amostral (Jesus *et al.* 2013). Para determinação da frequência mensal o mesmo cálculo foi efetuado, no entanto, cada mês de coleta foi considerado como uma unidade amostral. A abundância dos espécimes foi calculada com base na presença ou ausência de determinado táxon em cada tipo de isca/número total de iscas examinadas x 100 (Zak & Willig 2004). A estrutura da comunidade foi calculada por meio da (i) riqueza de espécies ( $S$ ); (ii) índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ) =  $-\sum_{i=1}^S p_i \cdot \log(p_i)$ , onde  $p_i$  é a proporção de espécies na comunidade; (iii) equitatividade ( $E$ ) =  $H'/H'_{\max}$ , onde  $H'_{\max}$  é o máximo valor da diversidade do número de táxons presentes; (iv) índice de dominância de Simpson ( $D$ ) =  $1 - \sum_{i=1}^S (p_i)^2$  calculado com base na abundância (Zak & Willig 2004).



Figuras 1-6. Alguns locais de coleta de solo no PEIC, núcleo Perequê.

A distribuição geográfica das espécies identificadas foi baseada em literatura (Milanez *et al.* 2007), complementada com trabalhos mais recentes. O sistema utilizado para a classificação dos táxons identificados foi o contido em Kirk *et al.* (2008), atualizado com trabalho de proposição da ordem Cladochytriales (Mozley-Standridge *et al.* 2009) por apresentar dados moleculares, ultraestruturais e nomenclaturais consistentes.

## Resultados e discussão

**Caracterização abiótica do solo do PEIC** - Foi observada maior heterogeneidade na umidade do solo, nos meses e locais amostrados (S1 a S15), com menor valor médio de 9% no S11 e maior de 60% no S3. Os mais baixos valores ocorreram em áreas de restinga (S11 e S15), onde o solo é mais arenoso (com menor capacidade de retenção de água) e possui vegetação baixa e esparsa (alta incidência de luz), enquanto os locais com elevados valores médios de umidade se localizam em áreas de Floresta Ombrófila (S1 a S8), com vegetação alta e dossel fechado (baixa incidência de luz) (Tabela 1). O pH do solo se mostrou ácido, com valores médios variando entre 3,7 a 5,7, com menor valor médio para o S13 e maior para o S2. A temperatura média não mostrou grandes variações, com mínima de 21°C e máxima de 24°C, sendo os meses mais quentes (Novembro/2012 e Fevereiro/2013) os que apresentaram maiores valores de temperatura. Embora exista uma clara relação entre teor umidade do solo e temperatura do ambiente (Voronin 2008), os meses mais quentes não foram os que apresentaram os menores valores de umidade, provavelmente reflexo da pluviosidade, textura dos solos e tipos de vegetação que nele ocorrem.

Tabela 1. Fatores abióticos mensurados no solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP, no período de estudo. Dp – desvio padrão.

Fatores abióticos	pH					Temperatura (°C)					Umidade (%)				
	Locais/Meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	média ± Dp	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	média ± Dp	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13
<b>S1</b>	5,4	4,8	5,8	5,8	<b>5,5 ± 0,4</b>	18	22	24	20	<b>21 ± 3</b>	32	33	35	38	<b>35 ± 3</b>
<b>S2</b>	5,4	5,4	6	6	<b>5,7 ± 0,7</b>	18	21	24	20	<b>21 ± 3</b>	28	34	40	29	<b>33 ± 6</b>
<b>S3</b>	4	4,5	5,7	5,4	<b>4,9 ± 0,7</b>	18	21	24	20	<b>21 ± 3</b>	58	58	62	63	<b>60 ± 3</b>
<b>S4</b>	4,1	3,9	4,2	4,8	<b>4,3 ± 0,3</b>	18	21	24	20	<b>21 ± 3</b>	29	38	52	48	<b>42 ± 10</b>
<b>S5</b>	4,2	4,1	3,8	4,4	<b>4,1 ± 0,4</b>	19	22	24	20	<b>21 ± 2</b>	41	30	34	34	<b>35 ± 5</b>
<b>S6</b>	4,5	4,4	4,7	5,2	<b>4,7 ± 0,3</b>	18	22	24	20	<b>21 ± 3</b>	18	40	40	45	<b>36 ± 12</b>
<b>S7</b>	4,6	4,6	4,3	4,7	<b>4,6 ± 0,3</b>	19	22	27	20	<b>22 ± 4</b>	26	22	38	29	<b>29 ± 7</b>
<b>S8</b>	5,3	4,6	4,5	4,4	<b>4,7 ± 0,3</b>	18	22	26	19	<b>21 ± 4</b>	24	32	40	39	<b>34 ± 7</b>
<b>S9</b>	5	4,4	4,9	5	<b>4,8 ± 0,4</b>	21	26	19	21	<b>22 ± 4</b>	26	21	24	30	<b>25 ± 4</b>
<b>S10</b>	5,5	4,5	4,6	4,9	<b>4,9 ± 0,3</b>	19	23	26	21	<b>22 ± 3</b>	13	15	30	35	<b>23 ± 11</b>
<b>S11</b>	5,1	4,7	4,7	5	<b>4,9 ± 0,9</b>	21	27	25	21	<b>24 ± 3</b>	2	1	16	16	<b>9 ± 8</b>
<b>S12</b>	4,5	2,5	4,7	3,8	<b>3,9 ± 0,7</b>	19	22	24	21	<b>22 ± 2</b>	23	57	20	68	<b>42 ± 24</b>
<b>S13</b>	3,4	3,5	4,4	3,6	<b>3,7 ± 0,9</b>	20	21	24	21	<b>22 ± 2</b>	45	28	29	54	<b>39 ± 13</b>
<b>S14</b>	5,3	4,4	4,7	6,1	<b>5,1 ± 0,6</b>	19	21	24	20	<b>21 ± 2</b>	47	26	30	21	<b>31 ± 11</b>
<b>S15</b>	4,9	4,6	5	4,1	<b>4,7 ± 0,4</b>	19	22	26	20	<b>22 ± 3</b>	12	6	13	19	<b>13 ± 5</b>

**Ocorrência e distribuição dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota no período de estudo** - Foram analisadas 60 amostras de solo, realizados 144 isolamentos e identificados 25 táxons, 19 em nível específico e seis em nível genérico. Os valores dos índices de diversidade de Shannon ( $H' = 2,6$ ), dominância de Simpson ( $D = 0,1$ ) e equitatividade ( $E = 0,9$ ), são similares aos encontrados por Nascimento *et al.* (2012) em solo de áreas de Cerrado do município de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, demonstrando uma comunidade diversa, com poucos táxons dominantes.

Os táxons identificados estão distribuídos nos Filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota, agrupados neste estudo dentro de quatro ordens (Blastocladales, Chytridiales, Cladochytriales e Rhizophydiales), com maior representatividade do Filo Chytridiomycota com 22 táxons (88%). Entre as ordens encontradas, Chytridiales foi a mais representada, com 13 táxons (52%) e Chytridiaceae a família com maior número de espécies, 36% do total de espécies encontradas (Tabela 2). Os meses de agosto e novembro de 2012, que correspondem a primeira e segunda coletas, apresentaram maior número de táxons e ocorrências, com 18 táxons em cada amostragem e 44 ocorrências em agosto/2012 e 40 em novembro/2012. Destes, oito táxons (*Allomyces* sp.1, *Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling, *Catenochytrium* sp, *Cladochytrium replicatum* Karling, *Entophlyctis* sp., *Diplophlyctis asteroidea* Dogma, *Phlyctochytrium aureliae* Ajello e *P. mucronatum* Canter), ocorreram exclusivamente durante essas duas amostragens (Tabela 2).

Oito táxons são primeiros registros para o PEIC. *Rhizophyidium coronum*, *R. sphaerotheca* e *R. stipitatum* são citados por Booth (1979) de solos de duna na região de Cananéia, entretanto o autor não especificou local de coleta das mesmas. A maioria dos táxons identificados das amostras de solo é considerada cosmopolita e com relato anterior no país (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Pires-Zottarelli &

Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012); no entanto, *Chytriomycetes lucidus* é citado pela primeira vez para o Brasil e *Phlyctochytrium mucronatum* para o Estado de São Paulo. Sete deles, *Cladochytrium tenue*, *Entophlyctis luteolus*, *Karlingiomyces granulatus*, *Karlingiomyces* sp., *Polychytrium aggregatum*, *Rhizophyidium sphaerotheca* e *Septochytrium* sp., ocorreram nas quatro amostragens (frequência de 100%). Entre os táxons menos frequentes (25%) podem ser citados, *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Catenophlyctis variabilis*, *Diplophlyctis asteroidea*, *D. complicata* e *Phlyctochytrium mucronatum*, ocorrendo somente uma vez ao longo das coletas. Dentre as espécies mais frequentes, *Karlingiomyces granulatus*, *Cladochytrium tenue* e *Septochytrium* sp., apresentaram respectivamente os maiores valores de abundância (2,14, 2,02 e 2,02%). *Septochytrium* sp não foi identificado em nível específico pela ausência de estruturas de resistência e pela dificuldade de purificação e cultivo dos espécimes.

Tabela 2. Ocorrência e distribuição de Blastocladiomycota e Chytridiomycota em amostras de solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, nas quatro diferentes amostragens. \* Primeira citação para o Brasil. \*\* Primeira citação para o Estado de São Paulo. F(%) = frequência e A (%) = abundância.

Táxons/Meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	F (%)	A (%)	Total
REINO FUNGI							
FILO BLASTOCLADIOMYCOTA							
BLASTOCLADIOMYCETES							
BLASTOCLADIALES							
BLASTOCLADIACEAE							
<i>Allomyces</i> sp. 1	1	0	0	0	25	0,12	
<i>Allomyces</i> sp. 2	0	0	1	0	25	0,12	
CATENARIAEAE							
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling	1	0	0	0	25	0,12	
FILO CHYTRIDIOMYCOTA							
CHYTRIDIOMYCETES							
CHYTRIDIALES							

Táxons/Meses	ago/12	nov/12	fev/13	jun/13	F (%)	A (%)	Total
CHYTRIDIACEAE							
<i>Chytrium appendiculatus</i> Karling	0	2	3	0	50	0,6	
<i>C. lucidus</i> Karling*	1	1	2	0	75	0,48	
<i>Karlingiomyces dubius</i> (Karling) Sparrow	0	2	2	3	75	0,83	
<i>K. granulatus</i> (Karling) Sparrow	5	4	3	6	100	2,14	
<i>Karlingiomyces</i> sp.	3	2	1	2	100	0,95	
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello	2	3	0	0	50	0,60	
<i>P. mucronatum</i> Canter**	0	1	0	0	25	0,12	
<i>Rhizidium verrucosum</i> Karling	1	0	0	1	50	0,24	
<i>Septosperma rhizophydii</i> Whiffen ex W.H. Blackw. & M.J. Powell	4	0	0	3	50	0,83	
ENDOCHYTRIAACEAE							
<i>Entophlyctis luteolus</i> Longcore	2	4	2	3	100	1,31	
<i>Entophlyctis</i> sp.	1	1	0	0	50	0,24	
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma	0	1	0	0	25	0,12	
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma	0	0	2	0	25	0,24	
CLADOCHYTRIALES							
CLADOCHYTRIAACEAE							
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	2	1	0	0	50	0,36	
<i>C. tenue</i> Nowakowski	5	5	3	4	100	2,02	
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello	1	2	1	1	100	0,6	
SEPTOCHYTRIAACEAE							
<i>Septochytrium</i> sp.	6	5	3	3	100	2,02	
INCERTAE SEDIS							
<i>Catenochytrium</i> sp.	1	1	0	0	50	0,24	
RHIZOPHYDIALES							
RHIZOPHYDIAACEAE							
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson	2	1	0	2	75	0,6	
<i>R. elyense</i> Sparrow	3	0	0	2	50	0,6	
<i>R. sphaerotheca</i> Zopf	3	2	1	2	100	0,95	
<i>R. stiptatum</i> Sparrow	0	2	0	2	50	0,48	
<b>Total de táxons</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>13</b>			<b>25</b>
<b>Total de ocorrências</b>	<b>44</b>	<b>40</b>	<b>24</b>	<b>34</b>			<b>144</b>

## REINO FUNGI

## FILO BLASTOCLADIOMYCOTA

## BLASTOCLADIOMYCETES

## BLASTOCLADIALES

## BLASTOCLADIACEAE

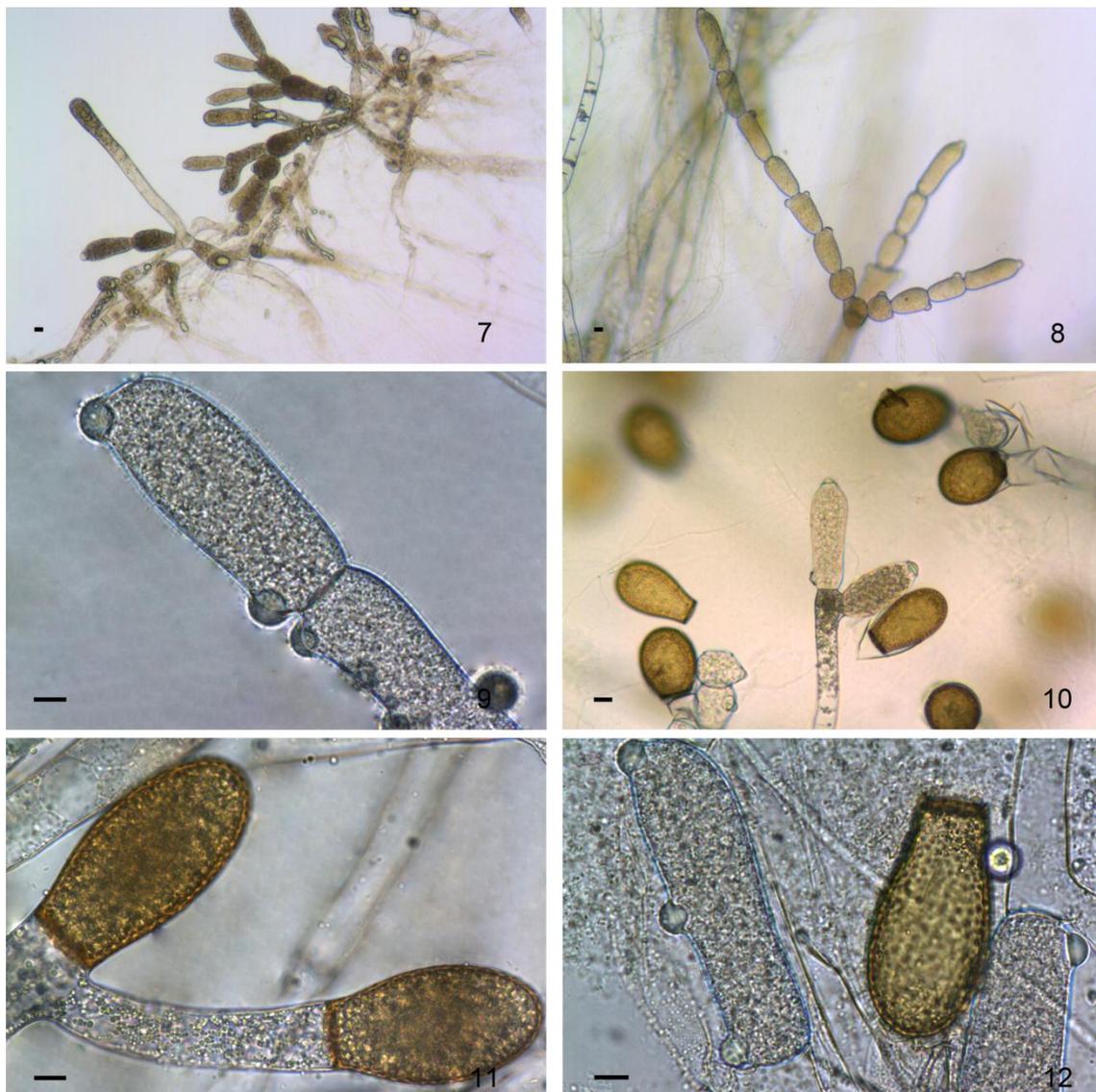
***Allomyces* sp.1**

Figuras 7-12

Talo esporófito típico. Hifas pseudoseptadas e ramificadas de modo simpodial ou dicotômico. Mitosporângios terminais ou em série catenulada de 2 a 10 por ramificação, fusiformes, 120-60 x 28-60  $\mu\text{m}$ , com 1 a 4 papilas; parede delgada. Meiosporângios esféricos ou subesféricos, 52,5-97,5 x 32,5-42,5  $\mu\text{m}$ ; ápice arredondado e base truncada, geralmente decíduos; coloração laranja com micropontuações na parede; parede espessa. Célula basal e liberação de planontes não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em sementes de *Sorghum* sp., amostras de solo 21-VIII-2012, *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4021; SP 445900).

Comentários: As principais características de *Allomyces* sp.1 são a produção de meiosporângios esféricos e subesféricos e mitosporângios catenulados em séries de até 10 estruturas por ramificação. Esta espécie foi isolada de amostra de solo de um pequeno lago temporariamente seco em área de restinga. A presença de mitosporângios catenulados é citada, entre os *Allomyces* de ciclo cystogenes, nas descrições de *Allomyces moniliformis* Coker & Braxton e *Allomyces neomoniliformis* Indoh (Sparrow 1960). O espécime do PEIC se assemelha mais a *A. neomoniliformis* principalmente pelo formato dos meiosporângios, pois em *A. moniliformis* são de ápice proeminente, característica não observada no isolado examinado; no entanto, outros estudos morfológicos e moleculares serão realizados para confirmação da identificação.



Figuras 7-12. *Allomyces* sp.1. 7-8. Mitosporângios catenulados. 9. Mitosporângios com papilas. 10-11. Meiosporângios. 12. Micropontuações na parede do meiosporângios. Barras = 10  $\mu$ m.

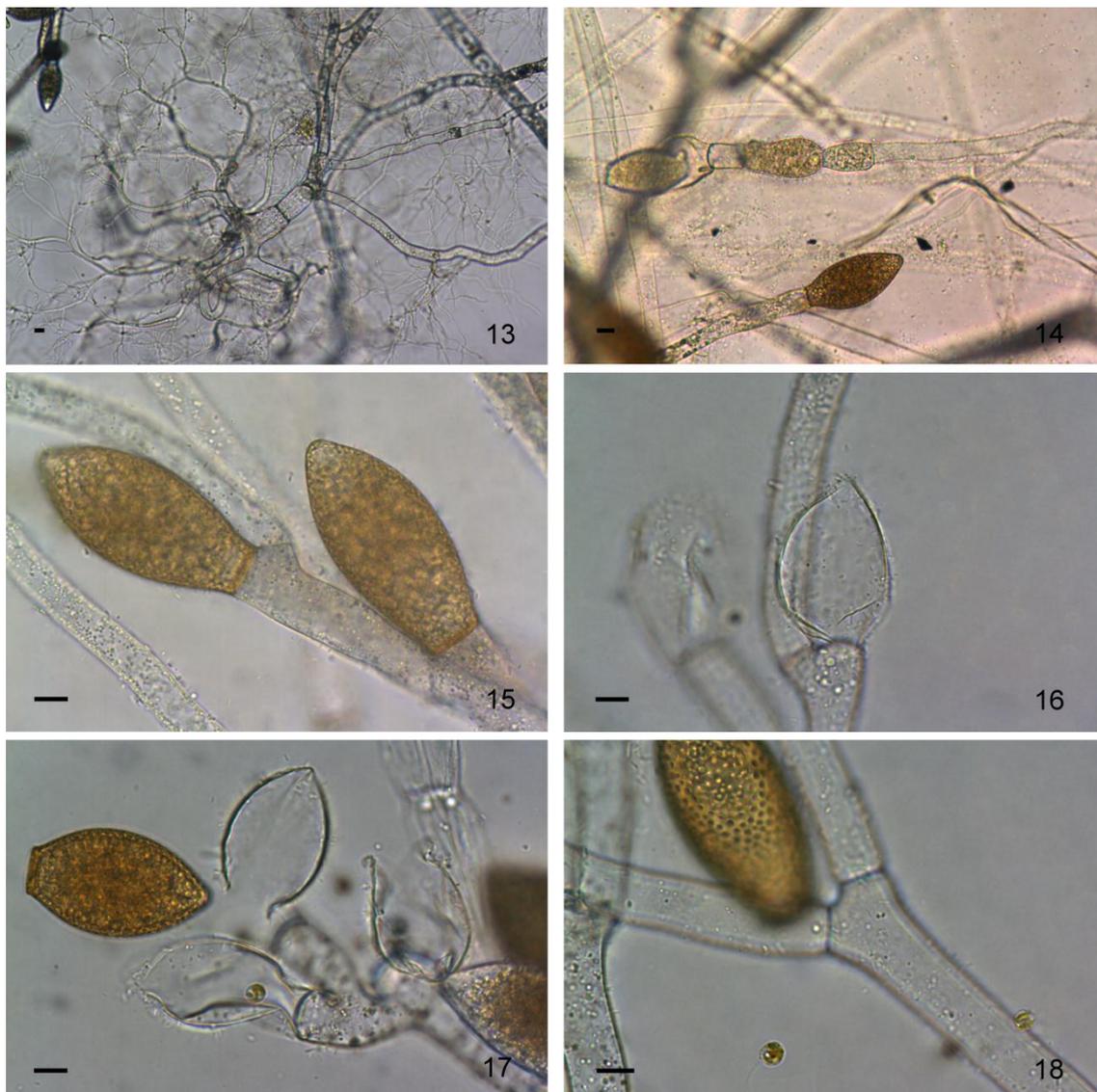
***Allomyces* sp.2**

Figuras 13-18

Talo esporofítico típico; célula basal esférica 20-100 µm diâm. ancorada por rizóides ao substrato. Hifas pseudoseptadas de tamanho variável e ramificadas dicotomicamente. Mitosporângios intercalares, fusiformes, 50-55 x 24-30 µm; parede delgada, com uma papila lateral. Meiosporângios terminais, ovóides 35-85 x 27,5-37,5 µm, base truncada e ápice proeminente, coloração alaranjada, com micropontuações na parede. Planontes dos esporos de resistência com dois flagelos posteriores, esféricos, 5-12,5 µm diâm. com uma gotícula lipídica conspícua.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em sementes de *Sorghum* sp., amostras de solo, 26-II-2013, 04-VII-2013, G.H. Jerônimo s.n (CCIBt 4020; SP 445899).

Comentários: A principal característica de *Allomyces* sp.2 é a produção de meiosporângios ovóides com ápice proeminente e planontes biflagelados com uma gotícula lipídica conspícua. O isolamento de *Allomyces* sp.2 foi realizado de amostra de solo após secagem em estufa a 40°C por cerca de dois dias, sendo reidratado e adicionadas sementes de *Sorghum* sp. Esse procedimento foi feito para minimizar a competição com outros fungos, pois a presença de meiosporângio permite que esta espécie passe por períodos de dessecação e sobreviva. O formato dos meiosporângios (ápice proeminente) e a presença de planontes biflagelados aproximam o isolado do PEIC de *Allomyces moniliformis* Coker & Braxton (Sparrow 1960); no entanto, outros estudos morfológicos e moleculares serão realizados para confirmação da identificação.



Figuras 13-18. *Allomyces* sp.2. 13. Celula basal. 14. Mitosporângios. 15-16. Meiosporângios. 17-18. Planontes e micropontuações no meiosporângio. Barras = 10 µm.

## CATENARIACEAE

*Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling, American Journal of Botany. 52: 134. 1965.

*Phlyctorhiza variabilis* Karling, American Journal of Botany. 34: 27. 1947.

Descrição: Capítulo 1 – página 43

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de solo 22-VIII-2012, *G.H. Jerônimo* (SP 445991).

## FILO CHYTRIDIOMYCOTA

## CHYTRIDIALES

## CHYTRIDIACEAE

*Chytriomyces appendiculatus* Karling, Bulletin of Torrey Botanical Club 74: 335. 1947.

Descrição: Capítulo 1 – página 45

Material examinado: BRASIL, São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de solo, 6-XI-2012, 26-II-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445874).

*Chytriomyces lucidus* Karling, Bulletin of Torrey Botanical Club 76: 353. 1949.

Figuras 19-21

Talo monocêntrico, eucárpico, extra-intramatrical. Rizóides extensos, surgindo da porção convexa do zoosporângio. Zoosporângios hialinos, operculados, lisos, não apofisados, com base invaginada, ovais, 17,5-25 x 12,5-30  $\mu\text{m}$ , subsféricos, 27,5-25 x

22,5-27,5 µm e esféricos, 20-25 µm diâm. Zoósporos móveis, ovais, 5-7 x 4-6 µm e esféricos, 5-7 µm diâm., com uma grande gotícula lipídica hialina, esférica 3-5 µm diâm. Esporo de resistência não observado.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de solo, 21-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2103, *G.H. Jerônimo s.n.* (SP 445876).

Comentários: A principal característica de *C. lucidus* que o torna único entre as espécies de *Chytriumyces* é a produção de zoosporângios operculados com base invaginada, zoósporos com uma grande gotícula lipídica hialina e produção de rizóides visualmente rígidos e duros na maturidade. Segundo Karling (1949), os rizóides desta espécie são muitas vezes similares aos de *Rhizidium*, com um eixo central longo e ramificado na base, característica também observada nos espécimes do PEIC. No entanto, a presença de rizóides visualmente rígidos e duros na maturidade não foi observada, pois a maioria dos isolados examinados não persistiu nas iscas celulósicas utilizadas, tendo impossibilitado a tentativa de cultivo. Os zoosporângios são menores que os descritos por Karling (1949), que cita zoosporângios entre 18-44 x 28-66 µm. O tamanho dos zoósporos concorda com as descrições de Karling (1949); no entanto, os isolados do PEIC também produziram zoósporos esféricos, o que não foi observado na descrição original da espécie. É a primeira citação da espécie para o Brasil.

*Karlingiomyces dubius* (Karling) Sparrow, *Aquatic Phycomycetes*, 2<sup>nd</sup> ed., p. 561, 1960.

*Karlingia dubia* Karling. *Mycologia*, 41: 513. 1949.

Descrição: Capítulo 1 – página 52

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de solo, 6-XI-2012, 7-XI-2012, 26-II-2013, 27-II-2013, 04-VII-2013, 05-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445879).

***Karlingiomyces granulatus*** (Karling) Sparrow, *Aquatic Phycomycetes*, 2<sup>nd</sup> ed., 563. 1960.

*Karlingia granulata* Karling, *Mycologia* 39: 57. 1947.

Descrição: Capítulo 1 – página 53

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de solo, 21-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 04-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445880).

***Phlyctochytrium aureliae*** Ajello, *Mycologia* 37: 110. 1945.

Descrição: Capítulo 1 – página 49

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola, palha de milho e grãos de pólen, amostras de solo, 6-XI-2012, 7-XI-2012, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 45894).

***Phlyctochytrium mucronatum*** Canter, *Transactions of the British Mycological Society* 32: 240. 1949.

Figuras 22-24

Talo eucárpico, monocêntrico, extramatricial. Sistema rizoidal delicado, pouco ramificado, com um eixo principal surgindo a partir de uma grande apófise oval 5-10 x 4-8  $\mu\text{m}$ . Zoosporângios inoperculados, hialinos, esféricos, 15-25  $\mu\text{m}$  diâm. piriformes 23-30 x 25-26  $\mu\text{m}$  e irregulares, ornamentados com finos espinhos laterais em forma de

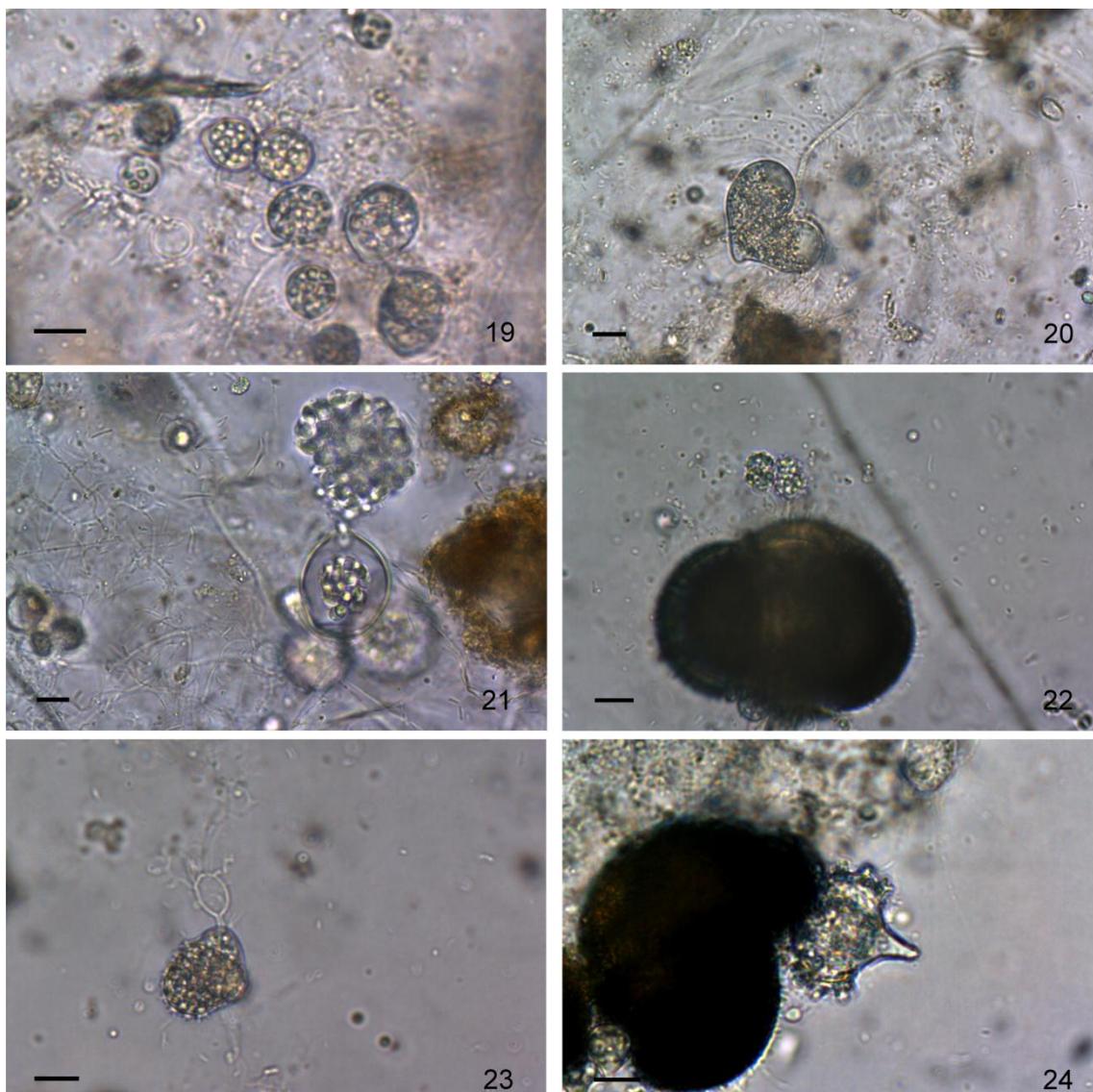
Y e um grande espinho piramidal apical de 5-10 x 7-8  $\mu\text{m}$ . Liberação dos zoósporos e formação de esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em grãos de pólen de *Pinus* sp., amostras de solo, 7-XI-2012, G.H. Jerônimo s.n (SP 445896).

Distribuição no Brasil: **Piauí** (Milanez *et al.* 2007).

Comentários: A principal característica de *P. mucronatum* é a produção de zoosporângios ornamentados com espinhos laterais em forma de Y e produção de um único espinho apical piramidal na maturidade. Canter (1949) encontrou esta espécie crescendo como sapróbio em *Closterium pritchardianum* Arch e *C. costatum* Corda ex Ralfs. Como citado pela autora, os talos normalmente formam três eixos principais; no entanto, pequenos talos podem apresentar somente um eixo, como observado nos espécimes do PEIC. Os talos, no início do desenvolvimento, possuem formato esférico e com o desenvolvimento assumem formato elipsoidal e podem posteriormente produzir zoosporângios de tamanhos e formatos diversos (Canter 1949), como também observado nos isolados examinados. Em pequenos zoosporângios não é possível observar o espinho apical que se torna evidente com o desenvolvimento, característica também observada nos espécimes examinados. Segundo Canter (1949), *P. mucronatum* é muito similar a outras espécies ornamentadas do gênero, como *P. planicorne* G.F. Atk., *P. dentiferum* Sparrow e *P. aureliae*, este último também encontrado no PEIC, mas nenhuma destas espécies anteriormente citadas possui tamanha variação na estrutura do talo. Além disso, o espinho apical claramente diferencia *P. mucronatum* de *P. aureliae*. Os zoosporângios dos espécimes examinados concordam com Canter (1949) e Rocha (2002). O tamanho do espinho piramidal apical concorda com Rocha (2002), mas são maiores que os originalmente descritos por Canter (1949) que cita 1,4-

5,2 x 0,9-4,3  $\mu\text{m}$ . A apófise é maior que a descrita por Canter (1949) que cita 1-3 x 3-5  $\mu\text{m}$ . A espécie foi citada pela primeira vez para o Brasil por Rocha (2002), sendo esta a segunda citação para o país e primeira para o Estado de São Paulo.



Figuras 19-24. *Chytrium lucidus* Karling. 19. Início do desenvolvimento dos zoosporângios. 20. Zoosporângios com base invaginada. 21. Liberação dos zoósporos. 22-24. *Phlyctochytrium mucronatum* Canter. 22. Início do desenvolvimento dos zoosporângios. 23. Zoosporângio apofisado. 24. Zoosporângio com espinho apical piramidal. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

*Rhizidium verrucosum* Karling, American Journal of Botany 31: 255. 1944.

Figuras 25-26

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal formado por um eixo principal de base ramificada. Zoosporângios inoperculados, ornamentados, esféricos, 20-32 µm diâm., coloração âmbar; ornamentações verrucosas. Liberação dos zoósporos e formação de esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de solo, 22-VIII-2012 e 05-VII-2013, G.H. Jerônimo s.n (SP 445898).

Distribuição no Brasil: **Rondônia e São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012).

Comentários: A principal característica de *R. verrucosum* é a produção de zoosporângios âmbar, ornamentados com pequenas incrustações semelhantes a verrugas. Foi isolado originalmente por Karling (1944) de substrato quitinoso (exúvia de insetos) e celulósico (epiderme de cebola). Os isolados do PEIC cresceram somente em substrato queratinoso (ecdise de cobra), como também mencionado por Pires-Zottarelli & Gomes (2007). Os zoosporângios dos isolados examinados são menores que os descritos por Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), que citam de 22,5-75 µm diâm.

*Septosperma rhizophydii* Whiffen ex Blackwell & Powell, Mycotaxon 42: 45. 1991.

Figuras 27-30

Talo eucárpico, monocêntrico, epi-endobiótico. Zoosporângios lisos, inoperculados, hialinos, esféricos, 5-15 µm diâm.; subesféricos, 10-12,5 x 7,5-12,5 µm e ovais, 7,5-12,5 x 5-7,5 µm. Liberação dos zoósporos não observada. Esporos de

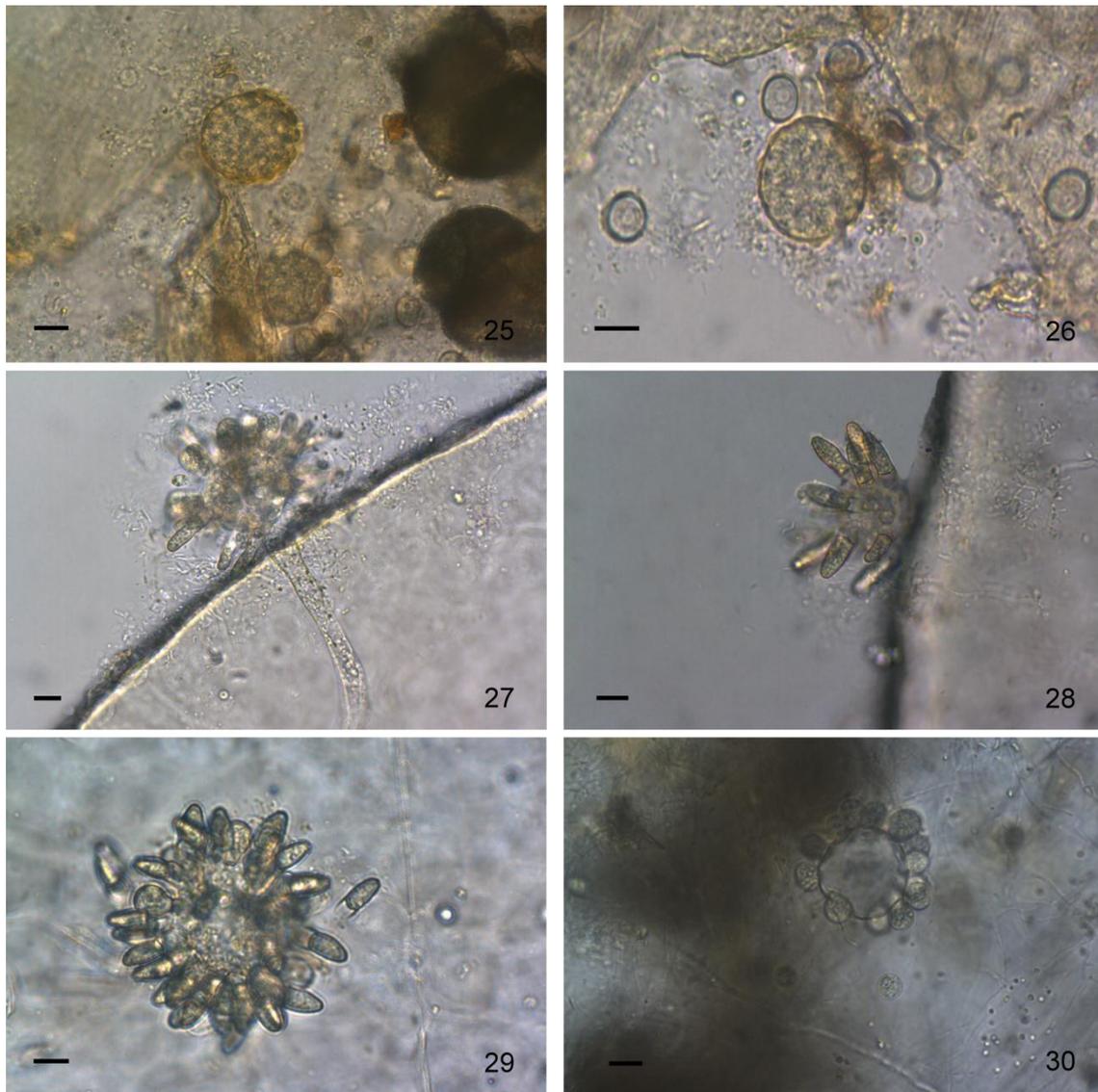
resistência abundantes, hialinos, clavados, 15-22,5 x 5-7,5  $\mu\text{m}$ , sesséis e/ou pedunculados, divididos em duas porções distintas, a basal vazia e a apical com um a vários glóbulos lipídicos; germinação não observada.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, parasita em *Rhizophydium* sp., amostras de solo, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 04-VI-2013, 05-VII-2013, G.H. Jerônimo s.n (SP 445889).

Distribuição no Brasil: **São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012).

Comentários: A principal característica de *S. rhizophydii* é a produção abundante de esporos de resistência clavados, divididos em duas porções distintas, a porção inferior ou basal é vazia e de menor tamanho, enquanto a apical ocupa a maior parte do espaço interno e pode ter numerosos glóbulos lipídicos. A partir da validação de *S. rhizophydii* por Seymour (1971) algumas importantes informações, principalmente sobre os esporos de resistência, tem sido mostradas. Karling (1977) observou que eles podem funcionar como prosperângios na germinação. Zattau (1981) observou tubérculos distribuídos nas paredes destas estruturas, fato melhor investigado por Blackwell & Powell (1991), através de microscopia de transmissão, que mostraram que essas estruturas estão presentes em quatro das cinco espécies do gênero, entre estas em *S. rhizophydii*, principalmente nas porções apicais dos esporos de resistência, com tamanhos que variam de 0,1-0,4 x 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ , característica não observada nos isolados examinados. Nos isolados do PEIC, bem como nas descrições de Whiffen (1942), Seymour (1971), Milanez (1974), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012), essa espécie foi encontrada parasitando espécies do gênero *Rhizophydium*. No entanto, Karling (1967) e Booth (1971) reportam a ocorrência de parasitismo em duas espécies do gênero *Chytriomycetes*, *Chytriomycetes hyalinus* e *C. poculatus*

Willoughby & Townley, respectivamente. Já Nascimento & Pires-Zottarelli (2009), observaram como parasita em *Entophlyctis luteolus*. Os zoosporângios concordam com as descrições de Whiffen (1942), Milanez (1974) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012), mas são pouco menores que os descritos por Pires-Zottarelli & Gomes (2007), que citam zoosporângios 12-15 x 6-11  $\mu\text{m}$ . Os esporos de resistência concordam com Milanez (1974), Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009, 2012), mas são menores que os descritos por Whiffen (1942), que descreve 4,1-16,4 x 6,1- 5,1  $\mu\text{m}$ . É a única espécie do gênero de ocorrência no Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 18 Dez. 2013).



Figuras 25-30. 25-26. *Rhizidium verrucosum* Karling. 25-26. Zoosporângio ornamentado. 27-30. *Septosperma rhizophydii* Whiffen ex Blackwell & Powell. 27. Aspecto geral em *Rhizophydium* sp. 28-29. Estruturas de resistência. 30. Zoosporângios. Barras = 10  $\mu$ m.

## ENDOCHYTRIACEAE

*Entophlyctis luteolus* Longcore, Mycologia 87: 27. 1995.

Descrição: Capítulo 1 – página 56

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de solo, 21-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 04-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4018; SP 445883).

*Diplophlyctis asteroidea* Dogma, Transactions of the British Mycological Society 67: 255. 1976.

Descrição: Capítulo 1 – página 59

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de solo, 6-XI-2012, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445885).

*Diplophlyctis complicata* (Willoughby) Dogma, Nova Hedwigia 25: 144. 1974.

Descrição: Capítulo 1 – página 61

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão, amostras de solo, 6-XI-2012, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445886).

## CLADOCHYTRIALES

## CLADOCHYTRIACEAE

*Cladochytrium replicatum* Karling, American Journal of Botany 18: 538. 1931.

Descrição: Capítulo 1 – página 69

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, amostras de solo, 21-VIII-2012, 6-XI-2012, *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4014; SP 445868).

*Cladochytrium tenue* Nowakowski, Cohn Beiträge zur Biologie der Pflagen 2: 92. 1877.

Descrição: Capítulo 1 – página 70

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola, amostras de solo, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 7-XI-2012, 26-II-2013, 04-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (CCIBt 4013; SP 445867).

*Polychytrium aggregatum* Ajello, Mycologia 34: 442. 1942.

Descrição: Capítulo 1 – página 72

Material examinado: BRASIL. São Paulo. Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em exoesqueleto de camarão e ecdise de cobra, amostras de solo, 22-VIII-2012, 6-XI-2012, 26-II-2013, 04-VI-2013, *G.H. Jerônimo s.n.* (CCIBt 4017; SP 445878).

## RHIZOPHYDIALES

### RHIZOPHYDIACEAE

*Rhizophydium coronum* Hanson, Torreyia 44: 31. 1944.

Descrição: Capítulo 1 – página 78

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de solo, 22-VIII-2012, 7-XI-2012, 4-VII-2013, 5-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445890).

*Rhizophydium elyense* Sparrow. Transactions of the British Mycological Society 40: 525. 1957.

Descrição: Capítulo 1 – página 79

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em ecdise de cobra, amostras de solo, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 4-VII-2013, 5-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n* (SP 445891).

*Rhizophydium sphaerotheca* Zopf, Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle 17: 92. 1887.

Figuras 31-33

Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal curto, delicado, levemente dilatado e ramificado. Zoosporângios esféricos, 12,5-32,5 µm diâm., lisos, hialinos, inoperculados, com 2 a 3 papilas de liberação dos zoósporos. Zoósporos encistados 2,5-5 µm diâm, com um único glóbulo lipídico hialino. Esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em epiderme de cebola e grãos de pólen de *Pinus* sp, amostras de solo, 21-VIII-2012, 22-VIII-2012, 7-XI-2012, 26-II-2013, 5-VII-2013, *G.H. Jerônimo s.n.* (CCIBt 4019; SP 445892).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Pernambuco, Piauí, Rondônia, São Paulo** (Schoenlein-Crusius *et al.* 2006, Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007).

Comentários: As principais características de *R. sphaerotheca* são a produção de zoosporângios esféricos com vários (2 a 3) poros de liberação dos zoósporos e a não formação de esporos de resistência. De acordo com Sparrow (1960), esta espécie é muito similar a *Rhizophydium poliinis-pini*, mas diferem pelo número e posição dos poros de liberação, que nesta última espécie é somente 1 na maturidade. As características dos zoosporângios e zoósporos estão de acordo com as descrições de Sparrow (1960) e Pires-Zottarelli & Gomes (2007).

***Rhizophydium stipitatum*** Sparrow, Transactions of the British Mycological Society 40: 527. 1957.

Figuras 34-36

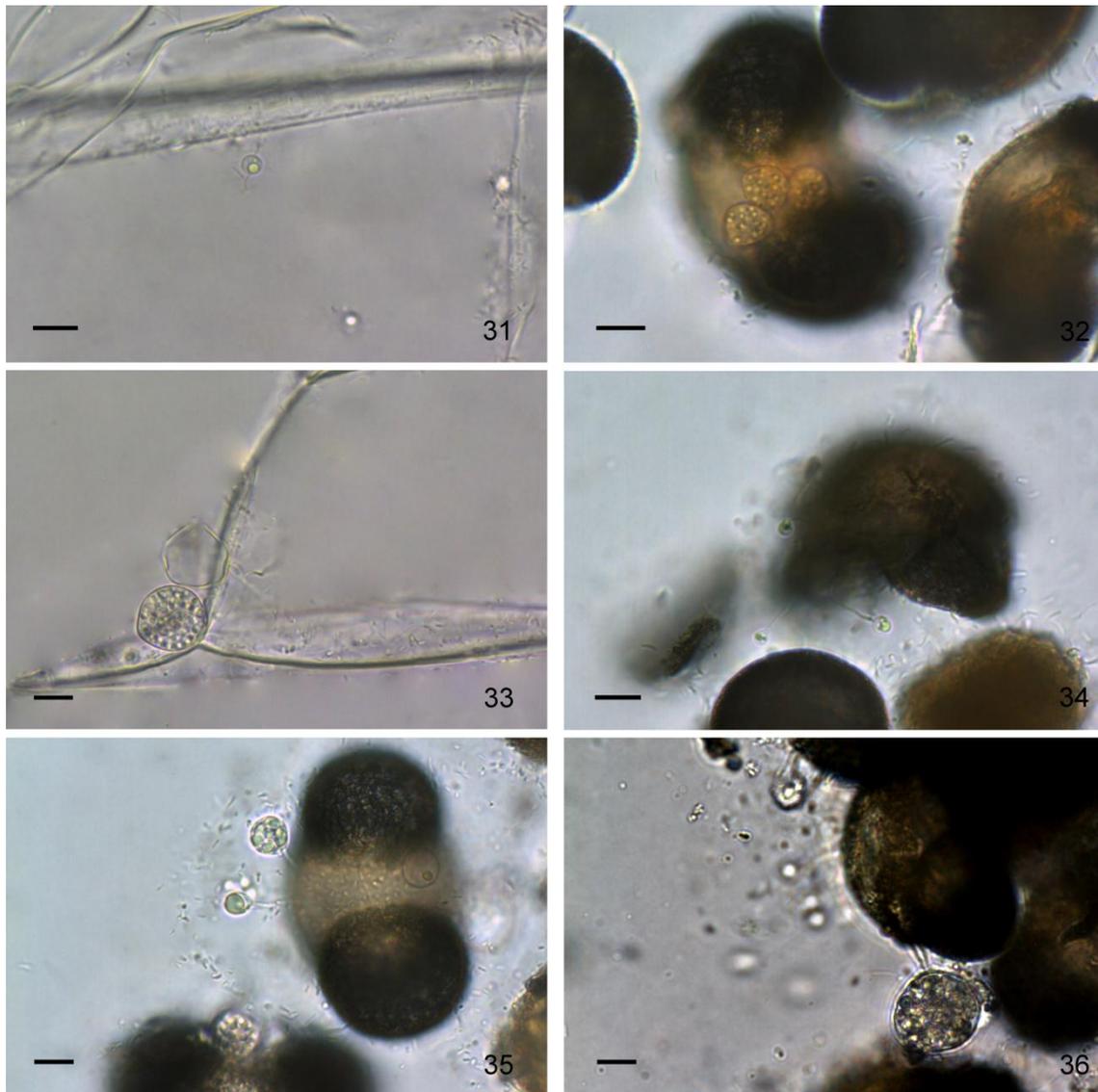
Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal pedunculado, extramatrical, saindo da base do zoosporângio. Zoosporângios lisos, hialinos, esféricos, 14-26 µm diâm. Zoósporos encistados, 3 µm diâm., com uma única gotícula lipídica hialina, formando um pedúnculo característico quando no substrato. Esporos de resistência não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, sapróbio em grãos de pólen de *Pinus* sp., amostras de solo, 6-XI-2012, 4-VII-2013, 5-VII-2013, *G. H. Jerônimo s.n.* (SP 445893).

Distribuição no Brasil: **Amazonas, Piauí, São Paulo** (Milanez *et al.* 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012).

Comentários: A principal característica de *R. stipitatum*, que o distingue das demais espécies do gênero, é a produção de zoosporângios apoiados por um sistema rizoidal pedunculado, extramatrical, que se projeta para fora do substrato. Nos isolados do PEIC foi possível observar esta característica desde o início do desenvolvimento. Segundo descrição de Sparrow (1957), esta espécie foi primeiramente encontrada em ecdise de

cobra, como também observado por Pires-Zottarelli & Gomes (2007) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2009), embora tanto nos isolados do PEIC como nos isolados da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, citados por Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), elas tenham ocorrido exclusivamente em grãos de pólen de *Pinus* sp. Esta espécie foi citada pela primeira vez para o Brasil em substratos celulósicos e grãos de pólen por Milanez (1984). Os zoosporângios dos isolados do PEIC são muito menores que os descritos por Sparrow (1957), que cita zoosporângios esféricos de 55-107  $\mu\text{m}$  diâm., mas concorda com Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Nascimento & Pires-Zottarelli (2009) e Nascimento & Pires-Zottarelli (2012). O tamanho dos zoósporos concorda com estes autores.



Figuras 31-36. 31-33. *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf. 31. Início do desenvolvimento dos zoósporos. 32. Zoosporângios intramatriciais. 33. Zoosporângios em epiderme de cebola. 34-36. *Rhizophydium stipitatum* Sparrow. 34. Início de desenvolvimento em grão de pólen. 35-36. Zoosporângio pedunculado. Barras = 10 µm.

**Ocorrência e distribuição dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota nos locais amostrados** - Quando consideramos a ocorrência e distribuição dos táxons nos locais de coleta (Tabela 3) verifica-se que *Cladochytrium tenue* (16,7%), *Entophlyctis luteolus* (11,7%), *Karlingiomyces granulatus* (11,7%) e *Septosperma rhizophydii* (10%) foram as espécies mais frequentes, ocorrendo em pelos menos 50% dos locais amostrados. A ampla distribuição destes táxons pode ser explicada, de acordo com Gleason *et al.* (2008), pela facilidade na produção de esporos de resistência, que conferem a estes organismos a capacidade de sobreviver em ambientes com amplas variações de umidade, temperatura e pH. Dentre os locais amostrados de solo, S13 foi o que demonstrou maior número de táxons, com 11 identificados, distribuídos nas ordens Chytridiales, Cladochytriales e Rhizophydiales.

Tabela 3. Ocorrência e distribuição dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota nos locais de coleta de solo, no núcleo Perequê do PEIC, durante o período de estudo. F(%) = frequência. S1 a S15 = locais amostrados.

Táxons/Locais de coleta	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	F(%)
REINO FUNGI																
BLASTOCLADIOMYCOTA																
BLASTOCLADIOMYCETES																
BLASTOCLADIALES																
BLASTOCLADIACEAE																
<i>Allomyces</i> sp.1										1						1,7
<i>Allomyces</i> sp.2											1					1,7
CATENARICEAE																
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling												1				1,7
FILO CHYTRIDIOMYCOTA																
CHYTRIDIOMYCETES																
CHYTRIDIALES																
CHYTRIDIACEAE																
<i>Chytriomycetes appendiculatus</i> Karling		1	1			1		1								6,7
<i>C. lucidus</i> Karling				1	1	1							1			6,7

Táxons/Locais de coleta	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	F(%)
<i>Karlingiomyces dubius</i> Karling (Sparrow)				1						2	2	1			1	8,3
<i>K. granulatus</i> Karling (Sparrow)	1	2	4	4	4	2		1								11,7
<i>Karlingiomyces</i> sp.				1				1				1	1			6,7
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello		1					1								1	5
<i>P. mucronatum</i> Canter															1	1,7
<i>Rhizidium verrucosum</i> Karling													1	1		3,3
<i>Septosperma rhizophydii</i> Whiffen ex W.H. Blackw. & M.J. Powell				1	1	1				1	1		2			10
ENDOCHYTRIACEAE																
<i>Entophlyctis luteulos</i> Longcore	1		3	2	1			1	1	2						11,7
<i>Entophlyctis</i> sp.						1			1	1			1			6,7
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma										1						1,7
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma						1		1								3,3
CLADOCHYTRIALES																
CLADOCHYTRIACEAE																
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling				1				1	1							5
<i>C. tenue</i> Nowakowski		1	3	1	1	2	1	4	2				1		1	16,7
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello				2				1	1					1		8,3

<b>Táxons/Locais de coleta</b>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	F(%)
<b>SEPTOCHYTRIACEAE</b>																
<i>Septochytrium</i> sp.	1	1		1		1	1									8,3
<i>INCERTAE SEDIS</i>																
<i>Catenochytrium</i> sp.										2						1,7
<b>RHIZOPHYDIALES</b>																
<b>RHIZOPHYDIACEAE</b>																
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson										1	1		1	1	1	8,3
<i>R. elyense</i> Sparrow		1									1	2	1			6,7
<i>R.sphaerotheca</i> Zopf				1				1				2	1		1	8,3
<i>R.stipitatum</i> Sparrow				1	2								1			5
<b>Total de táxons</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	
<b>Total de ocorrências</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	

**Preferência dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota por tipo de**

**substrato (isca)** - A importância dos substratos na taxonomia desses fungos foi demonstrada por Sparrow (1960) e Barr (2001). Sparrow (1960) forneceu uma longa lista de substratos nos quais esses organismos se desenvolvem e Barr (2001) salientou a plasticidade morfológica desses fungos em diferentes tipos de substratos e a capacidade de determinadas espécies, como *Rhizophyidium sphareocarpum* Zopf, de atuar como sapróbio e parasita. A ocorrência de cada um dos táxons nos substratos fornecidos como iscas em solo é mostrada na Tabela 4. A maioria dos táxons (65,5%) ocorreu em substratos celulósicos, seguidos por substratos quitinosos e queratinosos (17,2%). Esses dados numéricos provavelmente são reflexo de maior oferta de substratos celulósicos e/ou presença de mecanismos especializados para a degradação de compostos celulósicos como relatado por Gleason *et al.* (2008). Entre os substratos celulósicos, a epiderme de cebola foi a mais eficiente, responsável por 34,5% das ocorrências, seguida pela palha de milho (13,8%). O cabelo loiro de criança e o grão de pólen foram as iscas menos efetivas durante a iscagem, com somente três ocorrências nos grãos de pólen e nenhuma no cabelo. Os resultados encontrados corroboram com os de Rocha (2002) e Nascimento (2007), que também relatam a preferência dos táxons por substratos celulósicos, evidenciando a adaptação desses fungos na decomposição destes substratos. A grande maioria dos táxons (95,8%) ocorreu somente em um determinado tipo de substrato (estritamente celulolíticos, queratinofílicos ou quitinofílicos) e somente *Polychytrium aggregatum* ocorreu em diferentes tipos de substratos, provavelmente reflexo da maior capacidade enzimática desta espécie. *Septosperma rhizophydii* foi a única espécie parasita identificada neste estudo, a qual foi observada como parasita de *Rhizophyidium*, embora a não especificidade desta espécie seja relatada em literatura (Karling 1967, Booth 1971, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009).

Tabela 4. Ocorrência dos táxons de Blastocladiomycota e Chytridiomycota de solo em diferentes tipos de substratos utilizados como iscas. \* Espécie parasita de *Rhizophydium* sp.

Táxon/iscas	Epiderme de cebola	Palha de milho	Celofane	Semente de Sorghum	Grãos de pólen	Exoesqueleto de camarão	Cabelo loiro	Ecdise de cobra
REINO FUNGI								
BLASTOCLADIOMYCOTA								
BLASTOCLADIOMYCETES								
BLASTOCLADIALES								
BLASTOCLADIACEAE								
<i>Allomyces</i> sp.1				1				
<i>Allomyces</i> sp.2				1				
CATENARIACEAE								
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling								1
CHYTRIDIOMYCOTA								
CHYTRIDIOMYCETES								
CHYTRIDIALES								
CHYTRIDIACEAE								
<i>Chytrium appendiculatus</i> Karling						1		
<i>C. lucidus</i> Karling	1	1						
<i>Karlingiomyces dubius</i> Karling (Sparrow)						1		
<i>K. granulatus</i> Karling (Sparrow)	1							
<i>Karlingiomyces</i> sp.	1							
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello	1							
<i>P. mucronatum</i> Canter					1			
<i>Rhizidium verrucosum</i> Karling								1
<i>Septosperma rhizophydii</i> Whiffen ex W.H. Blackw. & M.J. Powell*								
ENDOCHYTRIAACEAE								
<i>Entophlyctis luteulos</i> Longcore	1	1						
<i>Entophlyctis</i> sp.	1							
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma						1		
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma						1		
CLADOCHYTRIALES								
CLADOCHYTRIAACEAE								
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	1	1						
<i>C. tenue</i> Nowakowski	1							
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello						1		1
SEPTOCHYTRIAACEAE								
<i>Septochytrium</i> sp.	1		1					
INCERTAE SEDIS								
<i>Catenochytrium</i> sp.		1						
RHIZOPHYDIALES								
RHIZOPHYDIAACEAE								

Táxon/iscas	Epiderme de cebola	Palha de milho	Celofane	Semente de Sorghum	Grãos de pólen	Exoesqueleto de camarão	Cabelo loiro	Ecdise de cobra
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson								1
<i>R.elyense</i> Sparrow								1
<i>R.sphaerotheca</i> Zopf	1							
<i>R.stipitatum</i> Sparrow					1			
<b>Total de táxons</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

O estudo contribuiu de modo significativo para o aumento do conhecimento da micota terrestre do PEIC, já que os táxons, *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Chytriomycetes lucidus*, *Phlyctochytrium mucronatum*, *Rhizidium verrucosum*, *Septosperma rhizophydii*, *Rhizophydium sphaerotheca* e *R. stipitatum* são primeiras citações para o parque. Além disso, quatro táxons (16%), *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Rhizophydium sphaerotheca* e *Entophlyctis luteolus* foram cultivados em meios de cultura, a partir de amostras de solo, e incluídos na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt), o que permitirá estudos mais aprofundados.. Estes resultados obtidos demonstram a importância dos estudos de biodiversidade, ao ampliar o conhecimento dos grupos em áreas de Mata Atlântica no Estado de São Paulo e no Brasil, bem como, contribuir para a ampliação de informação molecular destes fungos.

### Referências bibliográficas

- Ajello, L.** 1942. *Polychytrium*: A new cladochytriaceous genus. *Mycologia* 34: 442-451.
- Ajello, L.** 1945. *Phlyctochytrium aureliae* parasitized by *Rhizophydium chytriophagum*. *Mycologia* 37: 109-119.
- Barr, D.J.S.** 1970. *Phlyctochytrium arcticum* n. sp. (Chytridiales): morphology and physiology. *Canadian Journal Botany* 48: 2279-2283.

- Barros, F., Melo, M.M.R.F., Chiea, S.A.C., Kirizawa, M. et al.** 1991. Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso. Boletim do Instituto de Botânica pp. 1-184.
- Beneke, E.S., Rogers, A.L.** 1962. Aquatic Phycomycetes from the States of São Paulo, Minas Gerais and Paraná. *Rickia* 1: 181-193.
- Blackwell, W.H., Powell, M.J.** 1991. A nomenclatural synopsis of *Septosperma* (Chytridiomycetes) and emendation of *S. rhizophydii*. *Mycotaxon* 42: 43-52.
- Blackwell, M.** 2010. Fungal evolution and taxonomy. *Biocontrol* 55: 7-16.
- Bills, G.F., Christensen, M., Powell, M. & Thorn, G.** 2004. Saprobiic soil Fungi. Biodiversity of Fungi *In*: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.). Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Booth, T.** 1971. Occurrence and distribution of some zoosporic fungi from soils of Hibben and Moresby Island, Queen Charlotte Island. *Canadian Journal of Botany* 49: 951-965.
- Booth, T.** 1979. Strategies for study of fungi marine and marine influenced ecosystems. *Revista de Microbiologia* 10: 123-138.
- Canter, H.M.** 1949. Studies on British chytrids: VII. On *Phlyctochytrium mucronatum* n. sp. *Transactions of the British Mycological Society* 32: 236-240.
- Dogma Jr, I.J.** 1974. Studies on chytinophylic *Siphonaria*, *Diplophlyctis* and *Rhizoclosmatium*, Chytriales. III. *Nephochytrium complicatus* Willoughby: another *Diplophlyctis* with a sexual phase. *Nova Hedwigia* 25: 143-159.
- Dogma Jr, I.J.** 1976. Studies on chitinophilic *Siphonaria*, *Diplophlyctis* and *Rhizoclosmatium*, Chytridiales. V. *Diplophlyctis asteroidea*, a new species with resting spores. *Transactions of the British Mycological Society* 67: 255-264.

- Freeman, K.R., Martin, A.P., Karki, D., Lynch, R.C. et al.** 2009. Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soil. *PNAS* 106: 18315-18320.
- Gleason, F.H., Letcher, P.L. & McGee, P.A.** 2004. Some *Chytridiomycota* in soil recover from drying and high temperature. *Mycological Research* 108: 583-589.
- Gleason, F.H., Letcher, P. M. & McGee, P.A.** 2008. Freeze tolerance of soil chytrids from temperature climates in Australia. *Mycological Research* 112: 976-982.
- Gleason, F.H., Daynes, C.N. & McGee, P.A.** 2010. Some zoosporic fungi can survive grow and survive within a wide pH range. *Fungal Ecology* 3: 31-37.
- Hanson, A.M.** 1944. Three new saprofitic chytrids. *Torreya* 44: 30-34.
- Jesus, A.L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. *Hoehnea* 40: 167-180.
- Karling, J.S.** 1931. Studies in the Chytridiales VI. The occurrence and life history of a new species of *Cladochytrium* in cells of *Eriocaulon septangulare*. *American Journal of Botany* 18: 526-557.
- Karling, J.S.** 1944. Brazilian chytrids. II. New species of *Rhizidium*. *American Journal of Botany* 31: 254-261.
- Karling, J.S.** 1947a. Keratinophilic chytrids. II. *Phlyctorhiza variabilis* n. sp. *American Journal of Botany* 34: 27-32.
- Karling, J.S.** 1947b. Brazilian chytrids. X. New species with sunken opercula. *Mycologia* 39: 56-70.
- Karling, J.S.** 1947c. New species of *Chytriomycetes*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 74: 334-344.

- Karling, J.S.** 1949a. New monocentric eucarpic operculate chytrids from Maryland. *Mycologia* 41: 505-522
- Karling, J.S.** 1949b. Three new species of *Chytriomyces* from Maryland. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 76: 352-362.
- Karling, J.S.** 1965. *Catenophlyctis*, a new genus of the Catenariaceae. *American Journal of Botany* 52: 133-138.
- Karling, J.S.** 1967. Some zoosporic fungi of New Zealand. III. *Phlyctidium*, *Rhizophydium*, *Septosperma*, and *Podochytrium*. *Sydowia* 20: 74-85.
- Karling, J. S.** 1977. *Chytridiomycetorum Iconographia*. Lubrecht & Cramer, Vaduz.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter D.W. & Stalpers, J.A.** 2008. *Dictionary of fungi*. 10<sup>a</sup> ed. CABI Publishing, United Kingdom.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2005. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* 80: 115-133.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Churchill, P.F. & Chambers, J.G.** 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, of *Rhizophydiales* (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898-915.
- Longcore, J.E.**, 1995. Morphology and zoospore ultrastructure of *Entophlyctis luteolus* sp. nov. (Chytridiales): Implications for chytrid taxonomy. *Mycologia* 87: 25-33.
- Longcore, J.E. & Simmons, R.D.** 2012. The Polychytriales ord. nov. contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. *Mycologia* 104: 276-294.
- Milanez, A.I.** 1974. Notes on the *Septosperma Whiffen ex Seymour*. *Rickia* 6: 63-70.
- Milanez, A.I. & Trufem, S.F.B.** 1984. Fungos zoospóricos em frutos submersos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo. II. *Rickia* 11:77-84.

- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. *In:* O. Fidalgo, V.L. Bononi (coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série Documentos. São Paulo, Instituto de Botânica.
- Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Brazilian zoosporic fungi. Conselho Nacional de Pesquisa, São Paulo.
- Mozley-Standridge, S.E., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Porter, D. et al.** 2009. Cladochytridiales - a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research* 113: 498-507.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2009. Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23: 459-473.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2010. Blastocladales e Spizellomycetales do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 693-704.
- Nascimento, C.A., Gomes, E.P.C., de Souza, J.I. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2012. Zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles assembles from soil of Brazilian Cerrado areas. *Fungal Ecology* 5: 114-123.
- Negreiros, O.C., Carvalho, C.T., Cesar, S.F., Duarte, F.R. et al.** 1974. Plano de Manejo para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Instituto Florestal. *Boletim Técnico* 9: 1-56.
- Nowakowskii, L.** 1877. Beitrag zur Kenntniss der Chytridiaceen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2: 73-100.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* 7: 309-329.

- Rocha, J.R.S.** 2002. Fungos zoospóricos em área de cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Seymour, R.L.** 1971. Studies on mycoparasitic chytrids I. The genus *Septosperma*. Mycologia 63: 83-93.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J. et al.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodiversity Conservation 16: 49-67.
- Sparrow, F.K.** 1960. Aquatic Phycomycetes. University of Michigan Press. 2<sup>a</sup> ed. Ann Arbor.
- Sparrow, F.K.** 1957. A further contribution to the Phycomycete Flora of Great Britain. Transactions British of the Mycological Society 40: 523-535.
- Steciow, M.M., Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A., Marano, A.V. et al.** 2012. Zoosporic True Fungi, Heterotrophic Stramenipiles and Plasmodiophorids: Status of knowledge in South America. Darwiniana 50: 25-32.
- Ulken, A.** 1970. Phycomyceten aus der Mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). Veröffentlichungen des Institus für Meeresforschung in Bremerhaven 12: 313-319.
- Ulken, A.** 1972. Physiological studies on a Phycomycete from the Mangrove swamp at Cananéia, São Paulo, Brazil. Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven 13: 217-230.
- Voronin, L.V.** 2008. Zoosporic Fungi in Freshwater Ecosystems. Inland Water Biology 1: 341-346.
- Whiffen, A.J.** 1942. Two new chytrid genera. Mycologia 34: 543-557.
- Zak, J.C. & Willig, M.R.** 2004. Fungal biodiversity patterns *In*: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.). Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, San Diego.

**Zopf, W.** 1887. Ueber einige niedere Algenpilze (Phycomyceten) und neue Methode ihre Keime aus dem Wasser zu isolieren. Abhandlung der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle 17: 77-107.

## **Capítulo III**

**Análises moleculares e posicionamento  
filogenético de membros dos Filos  
Blastocladiomycota e Chytridiomycota  
do Brasil: possíveis modificações nas  
ordens Chytridiales e Cladochytriales**

RESUMO – (Análises moleculares e posicionamento filogenético de membros dos Filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Brasil: possíveis modificações nas ordens Chytridiales e Cladochytriales). Oito táxons de fungos zoospóricos, *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Cladochytrium replicatum* Karling, *Cladochytrium tenue* Nowak., *Entophlyctis luteolus* Longore, *Nowakowskiella multispora* Karling, *Polychytrium aggregatum* Ajello e *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf, foram isolados em meios de cultura a partir de amostras de água e solo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), município de Cananéia, Estado de São Paulo. Posteriormente foram realizados os procedimentos de extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA ribossomal e análises de máxima verossimilhança e Bayesiana posicionaram estes fungos em diferentes clados dentro de Blastocladiomycota e Chytridiomycota. *Cladochytrium tenue* e *N. multispora* foram incluídas pela primeira vez em análises filogenéticas. O posicionamento de *C. tenue*, espécie tipo do gênero *Cladochytrium* Nowak., dentro da ordem Chytridiales, traz importantes implicações para a nomenclatura e considerações sobre a morfologia do gênero *Cladochytrium*, e conseqüentemente para a família Cladochytriaceae e ordem Cladochytriales.

Palavras-chave: filogenia, fungos zoospóricos, Mata Atlântica.

ABSTRACT – (Molecular analysis and phylogenetic position of members of the phyla Blastocladiomycota and Chytridiomycota from Brazil: possible changes in the orders Chytridiales and Cladochytriales). Eight taxa of zoosporic fungi, *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Cladochytrium replicatum* Karling, *Cladochytrium tenue* Nowak., *Entophlyctis luteolus* Longore, *Nowakowskiella multispora* Karling, *Polychytrium aggregatum* Ajello and *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf, were isolated in the culture media from water and soil samples from the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso”

(PEIC), Cananéia municipality, São Paulo State. Subsequently, extraction, amplification, purification and sequencing of rDNA of these isolates were performed and analysis of maximum likelihood and Bayesian positioned these fungi in different clades within Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Cladochytrium tenue* and *N. multispora* were included for first time in phylogenetic analyzes. The placement of *C. tenue*, the type species of the genus *Cladochytrium* Nowak., within the order Chytridiales has important implications on nomenclature and considerations about the morphology of the genus *Cladochytrium* and consequently to the family Cladochytriaceae and the order Cladochytriales.

**Key words:** Atlantic Rainforest, phylogeny, zoosporic fungi.

## Introdução

Os fungos classificados nos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota apresentam como similaridade a produção de esporos com um único flagelo liso, posteriormente inserido e o posicionamento basal na árvore filogenética dentro do reino dos fungos (Hibbett *et al.* 2007). A taxonomia clássica, tradicionalmente apoiada nas características morfológicas como tipo de desenvolvimento do talo, presença ou ausência de opérculo, morfologia dos zoosporângios e presença e tipo de esporos de resistência (Sparrow 1960, Karling 1977, Barr 1980), tem se reestruturado como consequência de análises ultraestruturais dos zoósporos, bem como, pelos recentes estudos moleculares (James *et al.* 2000, 2006a, Letcher *et al.* 2006, 2008a,b, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Longcore & Simmons 2012). O primeiro estudo filogenético a demonstrar que a classificação do Filo Chytridiomycota, em especial da ordem Chytridiales sensu Barr (1980), era artificial, foi conduzido por James *et al.* (2000). Esta polifilia foi posteriormente corroborada pela criação do Filo Blastocladiomycota (James *et al.* 2006a), a partir de análises realizadas com representantes da ordem Blastocladales (anteriormente classificada dentro do Filo Chytridiomycota), e também pela subsequente criação das ordens Rhizophydiales (Letcher *et al.* 2006) e Cladochytriales (Mozley-Standridge *et al.* 2009) a partir de Chytridiales sensu Barr (1980).

Desde a sua proposição em 2009, a ordem Cladochytriales S.E. Mozley-Standridge passou por poucas alterações na composição dos seus clados constituintes, exceção realizada recentemente com a inclusão de *Cylindrochytridium johnstonii* Karling dentro da ordem (Steiger *et al.* 2011). Dentro desta ordem, *Cladochytrium tenue* Nowak. ocupa posição de grande importância, por representar a espécie-tipo (Clements

& Shear, 1931) do único gênero incluído na família Cladochytriaceae (Mozley-Standridge *et al.* 2009). O nome da ordem deriva do nome da primeira família validamente publicada (Cladochytriaceae) por J. Schröter em 1892 (artigo 11.3, do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas de McNeill *et al.* 2012) e por isso o posicionamento da espécie tipo do gênero *Cladochytrium* Nowak. é crucial para a estabilidade da ordem. Embora alguns trabalhos tenham reportado a ocorrência de *C. tenue* no Brasil (Karling 1945, Rocha 2002, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012) e no mundo (Sparrow 1943, 1960, Gaertner 1954), nenhum deles menciona o isolamento desta espécie em cultura pura, tendo sido a ordem Cladochytriales proposta sem a inclusão de informações moleculares da mesma.

Os principais artigos abordando a diversidade filogenética dos Filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota foram realizados com diversas sequências gênicas de isolados provenientes da América do Norte, principalmente dos Estados Unidos (James *et al.* 2000, 2006a,b, Letcher *et al.* 2006, 2008a, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Longcore & Simmons 2012). Poucos dados de isolados da América do Sul, com exceção de Letcher *et al.* (2008b) e Velez *et al.* (2013), que utilizaram isolados da Argentina, estão disponíveis e para o Brasil nenhum trabalho com este enfoque havia sido realizado até então. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram contribuir com informações moleculares e filogenéticas de isolados dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota identificados a partir de levantamento da diversidade destes grupos no Estado de São Paulo, Brasil, bem como, disponibilizar suas sequências gênicas no GenBank, e deste modo, ampliar o conhecimento sobre a filogenia de representantes destes filos.

## Material e Métodos

### Cultivo de representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota

Os táxons selecionados foram purificados em meios de cultura específicos para cada Filo. Para os representantes de Chytridiomycota foram utilizados PmTG (0,4 g/L de leite peptonizado, 0,4 g/L de triptona e 10 g/L de ágar) e mPmTG (0,2 g/L de leite peptonizado, 0,2 g/L de triptona e 10 g/L de ágar) - Longcore (1995). Já para Blastocladiomycota foi utilizado MP<sub>5</sub> (4 g/L de maltose, 1 g/L de peptona, 15 g/L de ágar) - Beneke & Rogers (1962). Para cada meio foram adicionados 200mg/L de sulfato de estreptomicina e penicilina G nos estágios iniciais de isolamento.

Os táxons foram isolados a partir de pequenos fragmentos de iscas ou de zoósporos capturados quando liberados dos zoosporângios. Além disso, um dos táxons do gênero *Allomyces* Butler (*Allomyces* sp.2) foi isolado através da secagem prévia da amostra de solo (40°C por dois dias) com posterior adição de 30 mL de água destilada autoclavada e duas metades de sementes de *Sorghum* sp. esterilizadas.

### Produção de biomassa de representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota

Para obtenção de biomassa, fragmentos de culturas puras (9 mm de diâm.) foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL (triplicata), contendo cerca de 50 mL de meio de cultura PmTG líquido, os quais foram mantidos em mesa agitadora orbital analógica SPLabor - Modelo SP-180/A, a 120 rpm e temperatura ambiente durante 15 dias. Após este período, a biomassa produzida foi filtrada em papel de filtro e náilon (10 x 10 cm) com auxílio de bomba a vácuo (Souza *et al.* 2008, modificado) e armazenada em frascos de penicilina de 12 mL, onde foram congeladas e posteriormente liofilizadas em Edwards Freez Dryer Mod D. Além disso, foi testada a produção de biomassa por meio

de microcultivo (Lamour & Finley 2006, modificado) com substituição de etapas automatizadas por manuais e microtubos ao invés de microplacas. Para isso, pequenos fragmentos de culturas puras foram inoculadas em microtubos Eppendorf (1,5-2,0 mL) contendo 1 mL de meio de cultura PmTG líquido, esterilizados e incubados em mesa agitadora em temperatura ambiente durante 7-10 dias, com posterior filtragem, congelamento e liofilização.

### **Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA genômico de representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota**

O DNA genômico foi extraído de culturas puras, com auxílio do Kit de extração “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen™), por meio de três métodos diferentes: 1) extração a partir de biomassa liofilizada, 2) extração a partir de biomassa fresca (retirada diretamente do meio de cultura sólido) e 3) extração a partir de biomassa obtida por meio de microcultivo. Durante a etapa indicada para a lise de células e tecidos foram adicionados 180 µL de tampão de digestão e 30 µL de proteinase K aos microtubos contendo os pellets de biomassa. O material de cada microtubo foi macerado com pistilo (PES-15-B-SI, Axygen®) e incubado em um termobloco (Kasvi, “model K80-S01”) a 55°C durante 1 h para a completa lise das células e liberação do DNA. Após este procedimento foram realizadas as etapas consecutivas para a lavagem e eluição do DNA com 30 µL de tampão de eluição através das colunas de purificação do kit (“PureLink Spin Columns”) para a obtenção de DNA genômico. A eficiência da extração de DNA foi avaliada após eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), com adição de 3,5 µL de “GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in water” (Biotium™), submersos em tampão TBE 1x, aplicando-se 2 µL de padrão “123 pb DNA Ladder” (Invitrogen™) + 2 µL de “Gel Loading solution, Type I, 6x” (Sigma®) e 2 µL de DNA.

A eletroforese foi realizada em sistema “Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis System” (Bio-Rad) acoplado a uma fonte “PowerPac<sup>™</sup> Basic Power Supply” (Bio-Rad) ajustada para 100 V durante 40 minutos. Os géis de agarose foram visualizados em um transiluminador UV (Kasvi) e fotografados com máquina digital comum. O DNA genômico foi armazenado em congelador comum (~ -20°C) para as etapas seguintes. Para amplificação do DNA os pares de “primers” NS4/SR1R(NS1) e ITS4/ITS5 foram utilizados para a amplificação das regiões 18S (SSU) e ITS, respectivamente (White *et al.* 1990), enquanto o par LR0R/LR5 (Vilgalys 2013) foi utilizado para amplificar a região 28S (LSU). As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o “PCR Supermix kit” (Invitrogen<sup>™</sup>) em microtubos de 200 µL com volume final de 25 µL, sendo: 22,5 µL de “PCR Supermix”, 0,75 µL de cada primer na concentração de 10 µM e 1 µL de DNA genômico. Os microtubos foram incubados em um termociclador “C1000 Touch<sup>™</sup> Thermal Cycler” (Bio-Rad) utilizando-se o ciclo “Standard PCR” (Dr. Timothy Young James, comunicação pessoal): 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 54°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos. A eficiência da PCR e a quantificação do DNA foram avaliadas após eletroforese conforme descrito, aplicando-se 2 µL de “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen<sup>™</sup>), 2 µL de “Gel Loading” e 4 µL de DNA. O material amplificado foi armazenado em geladeira (5-8°C) e purificado com “AxyPrep PCR Clean-up Kit” utilizando-se 25-30 µL de tampão eluente e avaliado em gel de eletroforese aplicando-se 2 µL de “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen<sup>™</sup>), 2 µL de “Gel Loading” e 2 µL de DNA. O material puro foi armazenado no congelador a -20°C.

O sequenciamento do DNA purificado foi realizado em um sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies<sup>™</sup>) instalado no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, USP (<http://genoma.ib.usp.br>). Para cada reação de

sequenciamento foi enviado um microtubo de 200  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}$  de DNA na concentração de 25-30  $\text{ng}/\mu\text{L}$  e 2,5  $\mu\text{L}$  de cada primer na concentração de 5  $\mu\text{M}$ ., totalizando um volume de 7,5  $\mu\text{L}$  por frasco.

### **Análises filogenéticas realizadas para os representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota**

A região ITS foi utilizada em nossas análises para confirmação das identificações morfológicas por meio da construção de árvores de máxima verossimilhança com representantes dos Filos Chytridiomycota e Blastocladiomycota. As sequências consenso das regiões 18S (SSU), ITS e 28S (LSU) foram geradas através da análise dos cromatogramas no programa “Sequencher<sup>TM</sup> Version 4.1.4”. Sequências parciais das regiões 18S (SSU) e 28S (LSU) dos isolados do PEIC, juntamente com as demais sequências selecionadas no GenBank, foram concatenadas no programa Seaview 4.4.2 e posteriormente alinhadas online em (<http://www.phylo.org/>) pela ferramenta MAFFT (7.058). A edição das sequências foi realizada automaticamente pela ferramenta Gblocks 0.91b e manualmente no programa GeneDoc 2.7 (Nicholas & Nicholas 1997). Os procedimentos de alinhamento e edição das sequências para a região ITS (analisada separadamente) foram efetuados como descrito acima. A escolha das sequências foi feita de modo a representar as principais classes e ordens dentro dos filios Blastocladiomycota e Chytridiomycota. O modelo de substituição nucleotídica, juntamente com a análise Bayesiana foram processados no programa “Topali<sup>©</sup> version 2.5”, com 1.000.000 de gerações, 4 corridas com frequência de amostragem de 100 e 25% de “burn in”, que representa o valor de árvores descartadas. As análises de máxima verossimilhança foram geradas no programa Seaview 4.4.2 (Gouy *et al.* 2010).

## **Resultados e Discussão**

### **Cultivo dos táxons em meios de cultura específicos**

De maneira geral houve dificuldade de obtenção de culturas puras devido à lenta taxa de crescimento destes fungos, corroborando com os comentários de Letcher & Powell (2005a). Além disto, outros fungos competidores, constantemente observados durante a etapa de isolamento, dificultaram a obtenção de culturas puras. Foi também observado que os antibióticos utilizados, principalmente o sulfato de estreptomicina, retardam muito o crescimento nos meios de cultura utilizados, sendo ideal a sua utilização somente durante a etapa de isolamento e purificação das culturas, com posterior remoção. O desenvolvimento em cultura pura dos táxons selecionados é mostrado nas figuras 1 a 22.

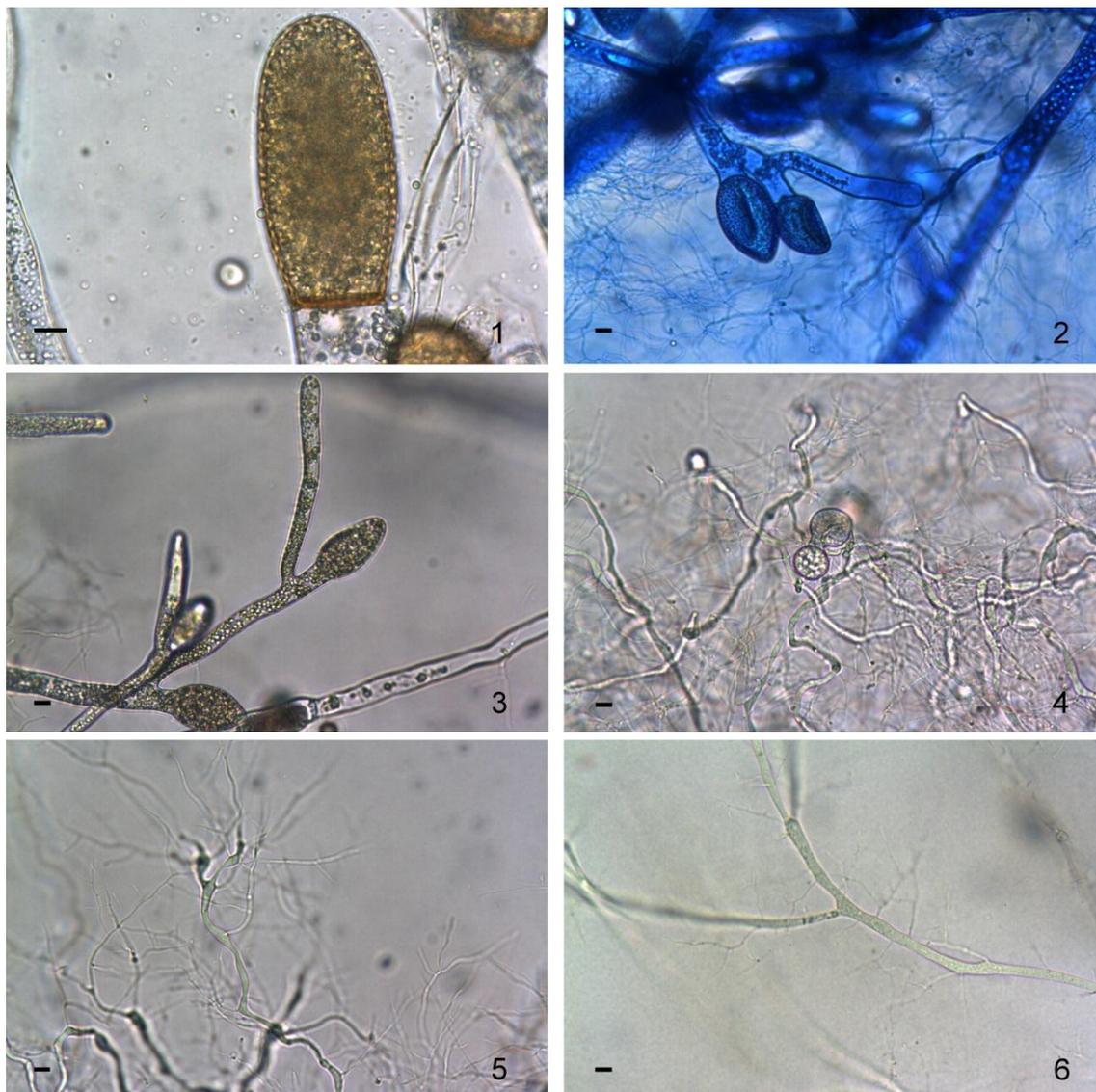
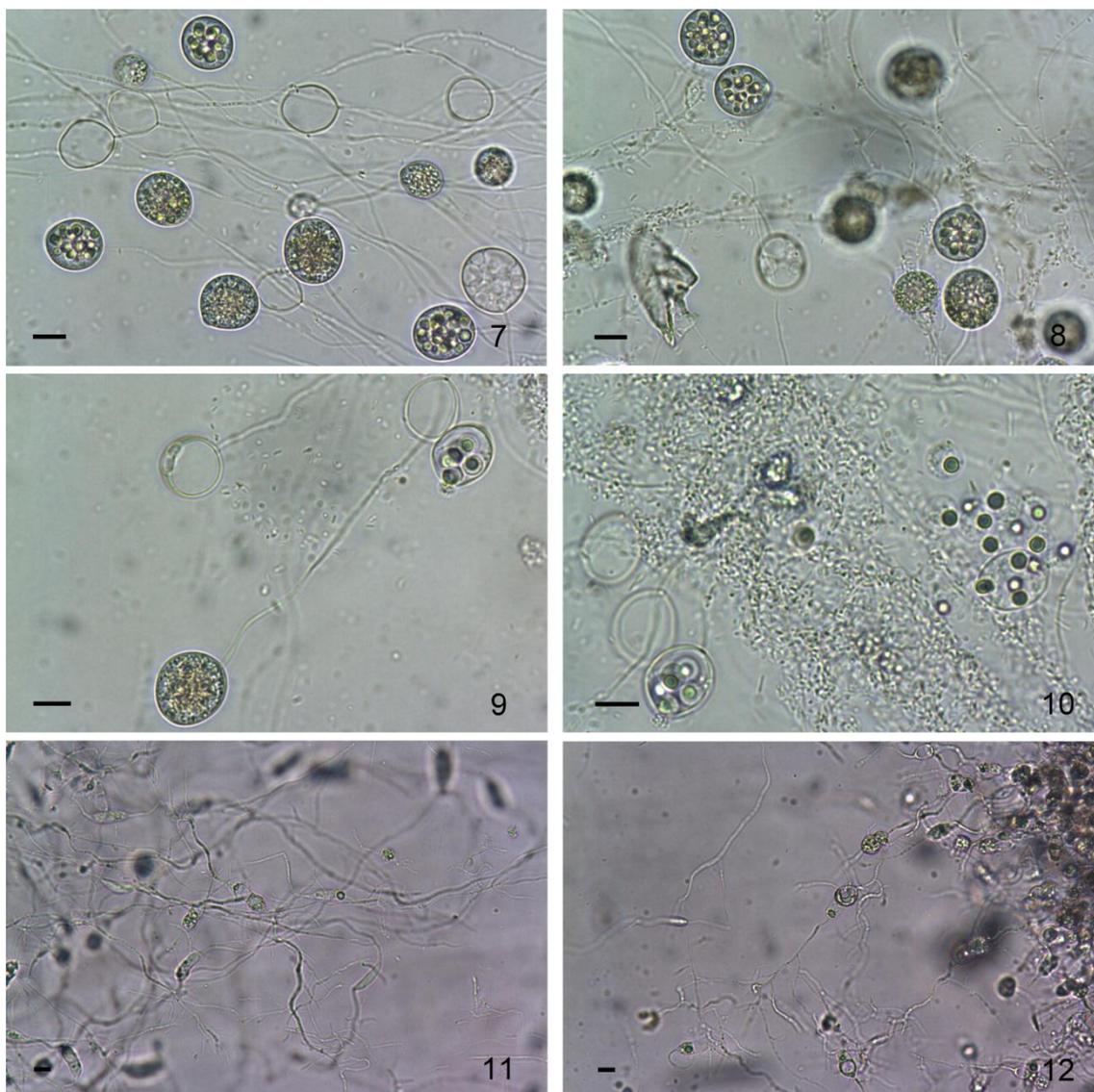
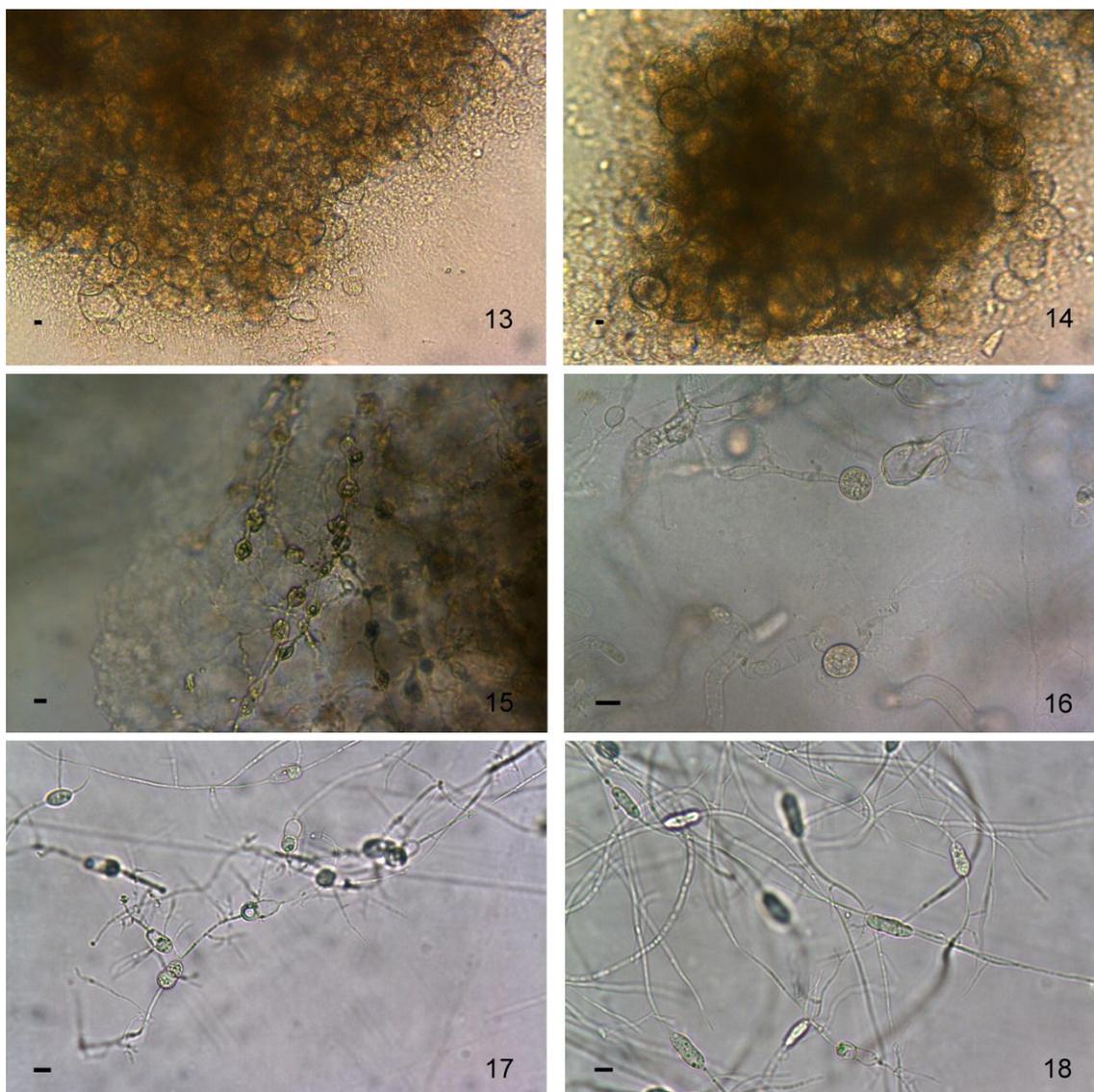


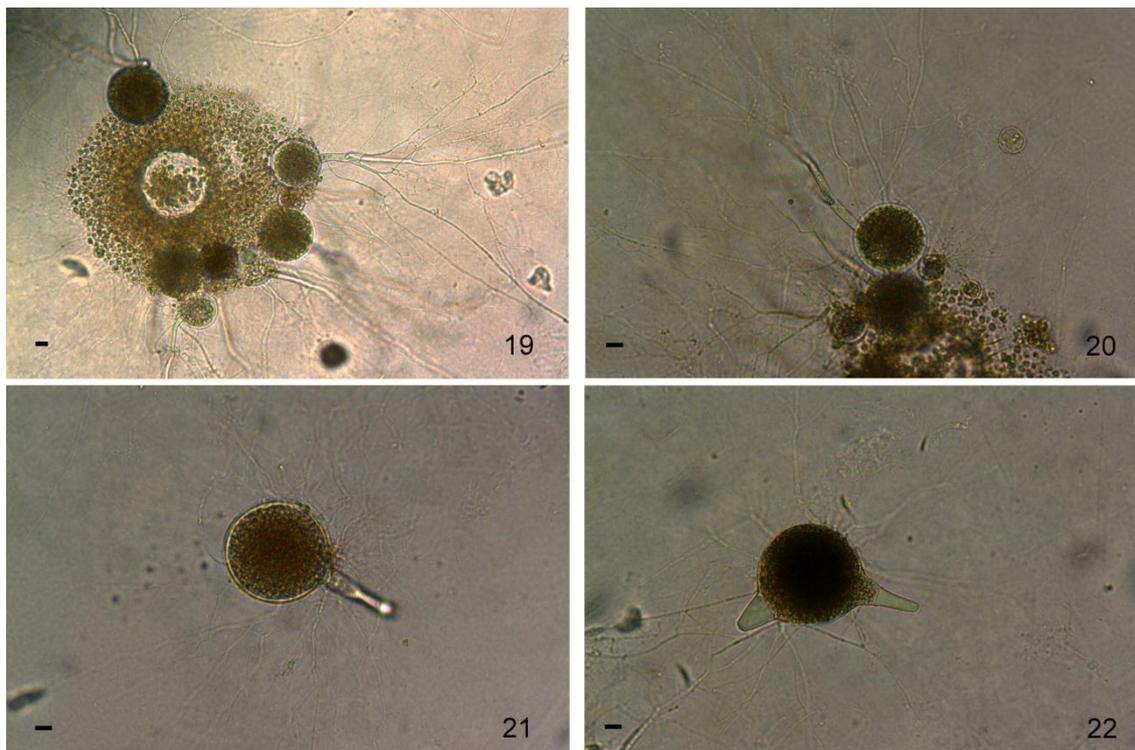
Figura 1. *Allomyces* sp.1. Meiosporângio em MP<sub>5</sub>. Figuras 2-3. *Allomyces* sp.2. 2. Meiosporângios em MP<sub>5</sub> corados com lactofenol e azul de algodão. 3. Meiosporângios em PmTG. Figuras 4-6. *Polychytrium aggregatum* Ajello. 4. Zoosporângios em PmTG. 5-6. Rizomicélio em PmTG.



Figuras 7-12. *Cladochytrium tenue* Nowak.. 7-8. Diferentes estágios de desenvolvimento dos zoosporângios em PmTG. 9-10. Liberação dos zoósporos em PmTG. 11-12. Rizomicélio com células turbinadas. Barras = 10  $\mu$ m.



Figuras 13-14. *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf. 13-14. Zoosporângios formando colônia em PmTG. Figuras 15-16. *Nowakowskiella multispora* Karling. 15-16. Zoosporângios e rizomicélio em PmTG. Figuras 17-18. *Cladochytrium replicatum* Karling. 17-18. Células turbinadas em PmTG. Barras = 10  $\mu$ m.



Figuras 19-22. *Entophlyctis luteolus* Longcore. 19-20. Zoosporângios em meio de cultura evidenciando a presença de sistema rizoidal. 21-22. Zoosporângios com tubos de liberação. Barras = 10  $\mu$ m.

### **Produção de biomassa de representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota**

Quanto à produção de biomassa, a utilização de frascos Erlenmeyer (250mL) com cerca de 50 mL de meio PmTG apresentou resultados melhores do que a técnica do microcultivo. A baixa disponibilidade de oxigênio, salientada em literatura, como fator limitante para o desenvolvimento destes fungos (Sparrow 1968), provavelmente também limitou o crescimento nos microtubos, já que a utilização de 1mL de meio de cultura líquido, em um microtubo de capacidade de 1,5mL, resultou em pequena disponibilidade de oxigênio para o crescimento do isolado. Entre os representantes de Chytridiomycota, nenhum deles cresceu por meio desta técnica, enquanto as duas espécies de Blastocladiomycota, *Allomyces* sp.1 e sp.2, cresceram, mas não

vigorosamente, sendo recomendado a não utilização ou a modificação do método. Já em frascos Erlenmeyers, todos os representantes cresceram bem, sendo recomendada a liofilização da biomassa no prazo máximo de 15 dias, mesmo em pequena quantidade, pois após este período a maioria das culturas apresenta contaminante (embora muitas vezes não sejam observados sem auxílio do microscópio).

### **Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA genômico de representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota**

Para *Entophlyctis luteolus*, *Cladochytrium replicatum*, *C. tenue*, *Nowakowskiella multispora*, *Polychytrium aggregatum* e *Rhizophydium sphaerotheca* a extração de DNA a partir de biomassa liofilizada foi a que apresentou melhores resultados. A extração a partir de biomassa fresca foi eficiente somente para os isolados monocêntricos que produziram muitas colônias em meio de cultura, como *Entophlyctis luteolus* e *R. sphaerotheca*, mas mesmo entre estes isolados a extração a partir de material liofilizado apresentou melhores resultados. Já para *Allomyces* sp.1 e *Allomyces* sp.2 a extração a partir da biomassa obtida pela técnica de microcultivo foi a mais eficiente. Os meios de cultura utilizados para isolamento e purificação, número de depósito na Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt), bem como as etapas moleculares realizadas com cada um dos oito táxons constam da Tabela 1. A amplificação do DNA foi a etapa laboratorial mais trabalhosa para a maioria dos isolados, em especial a região ITS, a qual foi a que apresentou maiores problemas, enquanto a região 28S foi a que apresentou melhores resultados. Para a amplificação da região ITS de *Allomyces* sp.1 e *Allomyces* sp.2 inúmeras tentativas foram realizadas, obtendo-se sucesso somente após a utilização de Rnase fornecida pelo Kit de extração “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen™).

Nestes fungos, especificamente o RNA, atrapalha muito o processo de amplificação (T.Y. James, comunicação pessoal). Foi observado também, que em culturas novas o DNA é extraído e amplificado com mais facilidade e as sequências resultantes são de melhor qualidade (ausência de bases ambíguas e equilíbrio de bases nitrogenadas). Devido à baixa qualidade das sequências (principalmente ITS) obtidas para *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Cladochytrium replicatum* e *C. tenue*, o processo precisou ser realizado várias vezes, afim de se obter sequências de boa qualidade, sendo as duas espécies de *Allomyces* enviadas por cinco vezes.



## **Análises filogenéticas realizadas para os representantes de Blastocladiomycota e Chytridiomycota**

### **Análise da região ITS**

Na análise de máxima verossimilhança de representantes do Filo Chytridiomycota (Figura 23) o modelo de substituição selecionado foi GTR+I+G, enquanto para o Filo Blastocladiomycota o modelo foi GTR+I. Os números de acesso da região ITS das sequências do GenBank utilizadas nestas análises são mostrados na Tabela 2, enquanto dos isolados do PEIC são mostrados separadamente na Tabela 4. A análise de máxima verossimilhança da região ITS de representantes de Chytridiomycota (Figura 23) mostra que esta região fornece um bom indicativo para confirmação das identificações morfológicas. Isso ocorreu com os isolados *Polychytrium aggregatum* GHJ Brasil, *Rhizophyidium sphaerotheca* GHJ Brasil e *Nowakowskiella multispora* GHJ Brasil, que agruparam respectivamente, com as espécies *P. aggregatum* AFTOL24, *R. sphaerotheca* BR89 e *N. multispora* ALJ Brasil, com altos valores de suporte (100). Já entre os representantes de Blastocladiomycota (Figura 24), a região ITS não agrupou os isolados, *Allomyces* sp.1 e *Allomyces* sp.2, com as espécies *A. moniliformis* e *A. neomoniliformis*, as quais mais se aproximaram morfológicamente, como comentado no capítulo 2. No GenBank, existe somente uma sequência disponível da região ITS para a espécie *A. neomoniliformis* (CBS 105-52), a qual não foi incluída nesta análise devido a enorme quantidade de bases ambíguas consecutivas (48 de 611).

Tabela 2. Número de acesso das sequências das regiões ITS selecionadas no GenBank.

PEFI - sequências provenientes de estudo de Jesus *et al.* (2013).

Número da cultura/táxon	Ordem	Numero de acesso GenBank
		ITS (ITS1-5.8S-ITS2)
<b>FILO CHYTRIDIOMYCOTA</b>		
M29 <i>Nowakowskiella elegans</i>	Cladochytriales	AY353257
JEL127 <i>Nowakowskiella</i> sp.	Cladochytriales	AY997065
ALJ Brasil <i>Nowakowskiella multispora</i>	Cladochytriales	PEFI
ALJ Brasil <i>Cladochytrium replicatum</i>	Cladochytriales	PEFI
BR316 <i>Cladochytrium</i> sp.	Cladochytriales	JN943816
AFTOL27 <i>Cladochytrium replicatum</i>	Cladochytriales	AY997037
BR89 <i>Rhizophydium sphaerotheca</i>	Rhizophydiales	JN943817
JEL222 <i>Rhizophydium globosum</i>	Rhizophydiales	DQ485616
JEL136 <i>Rhizophydium brooksianum</i>	Rhizophydiales	DQ485613
JEL134 <i>Rhizophydium carpophilum</i>	Rhizophydiales	DQ485612
JEL396 <i>Rhizophydium</i> sp.	Rhizophydiales	DQ485629
AFTOL37 <i>Rhizophydium sphaerotheca</i>	Rhizophydiales	AY997082
AFTOL24 <i>Polychytrium aggregatum</i>	Chytridiales	AY997074
MP056 <i>Rhizoclosmatium globosum</i>	Chytridiales	JX905553
MP069 <i>Chytriomycetes hyalinus</i>	Chytridiales	JX905555
PL115 <i>Chytriomycetes hyalinus</i>	Chytridiales	JX905556
JEL324 <i>Endochytrium</i> sp.	Chytridiales	AY997044
JEL93 <i>Karlingiomyces</i> sp.	Chytridiales	AY997056
JEL347 <i>Rozella</i> sp.	<i>Incertae sedis</i>	AY997086
AFTOL297 <i>Rozella allomycis</i>	<i>Incertae sedis</i>	AY997087
<b>FILO BLASTOCLADIOMYCOTA</b>		
ATCC10982 <i>Allomyces anomalus</i>	Blastocladales	HQ888721
Austrália3 <i>Allomyces macrogynus</i>	Blastocladales	HQ888723
Cuba7 <i>Allomyces javanicus</i>	Blastocladales	HQ888720
AFTOL300 <i>Allomyces arbuscula</i>	Blastocladales	AY997028
California1 <i>Allomyces javanicus</i>	Blastocladales	JN943672
CBS <i>Allomyces javanicus</i>	Blastocladales	AY349129
California70 <i>Allomyces reticulatus</i>	Blastocladales	JN943676
Texas1 <i>Allomyces arbuscula</i>	Blastocladales	HQ888724
WTBurma3-35 <i>Allomyces macrogynus</i>	Blastocladales	JN943673
MARCW16 <i>Allomyces arbuscula</i>	Blastocladales	HQ888729
WM105 <i>Allomyces moniliformis</i>	Blastocladales	HQ888728
India3 <i>Allomyces moniliformis</i>	Blastocladales	HQ888725
Denmark1 <i>Allomyces arbuscula</i>	Blastocladales	HQ888727
BelgianCongo1 <i>Allomyces arbuscula</i>	Blastocladales	HQ888726
California6 <i>Allomyces anomalus</i>	Blastocladales	HQ888722
JEL339 <i>Catenaria</i> sp.	Blastocladales	HQ888731
JEL298 <i>Catenophlyctis</i> sp.	Blastocladales	AY997034
JEL194 <i>Catenaria anguillulae</i>	Blastocladales	HQ888736
AFTOL301 <i>Basidiobolus ranarum</i>	<i>Incertae sedis</i>	AY997030
GBR10 <i>Olpidium brassicae</i>	<i>Incertae sedis</i>	AY373014

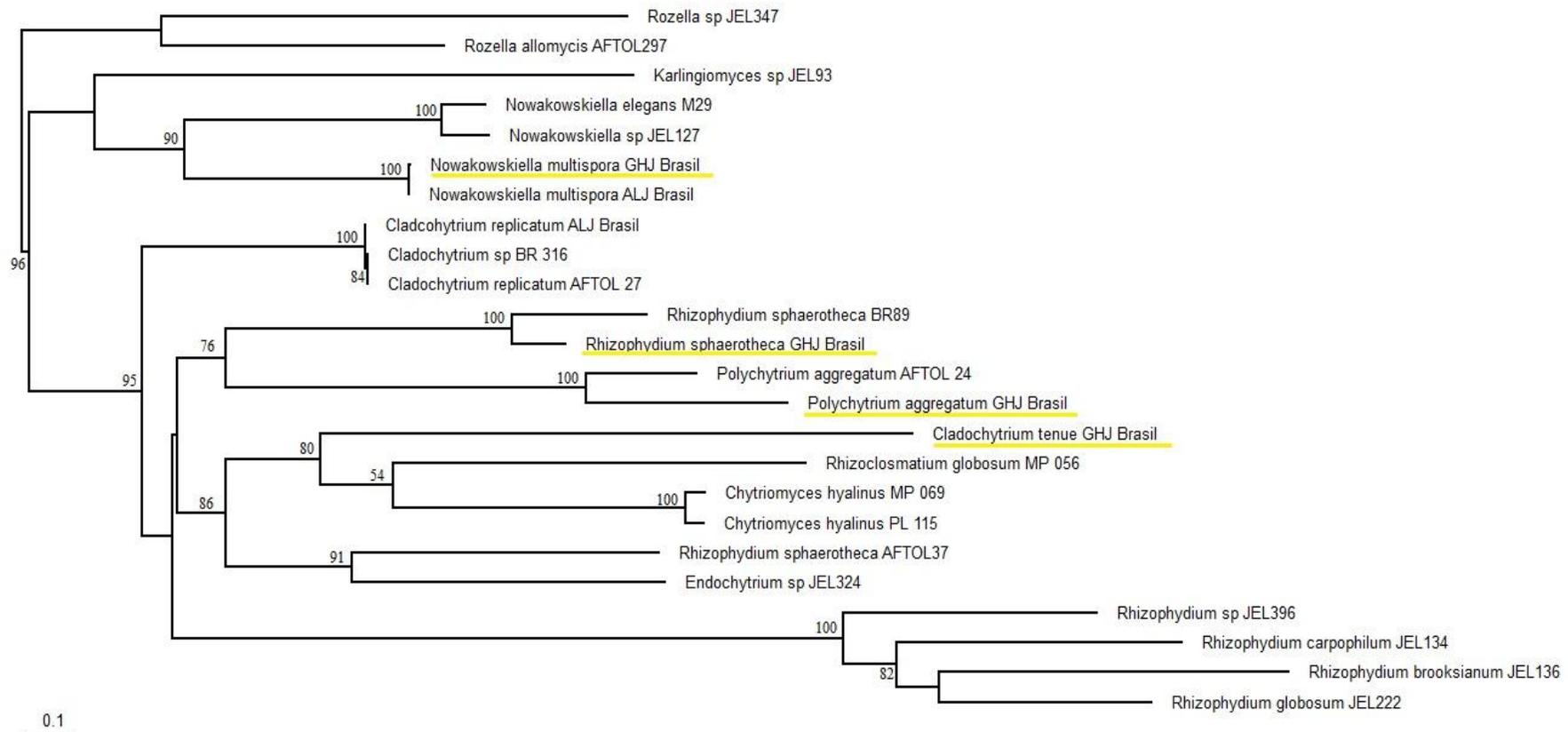


Figura 23. Análise de Máxima Verossimilhança da região ITS mostrando o posicionamento dos táxons de Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), destacados em amarelo. Os isolados com a identificação ALJ Brasil são provenientes do estudo realizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga por Jesus *et al.* (2013).

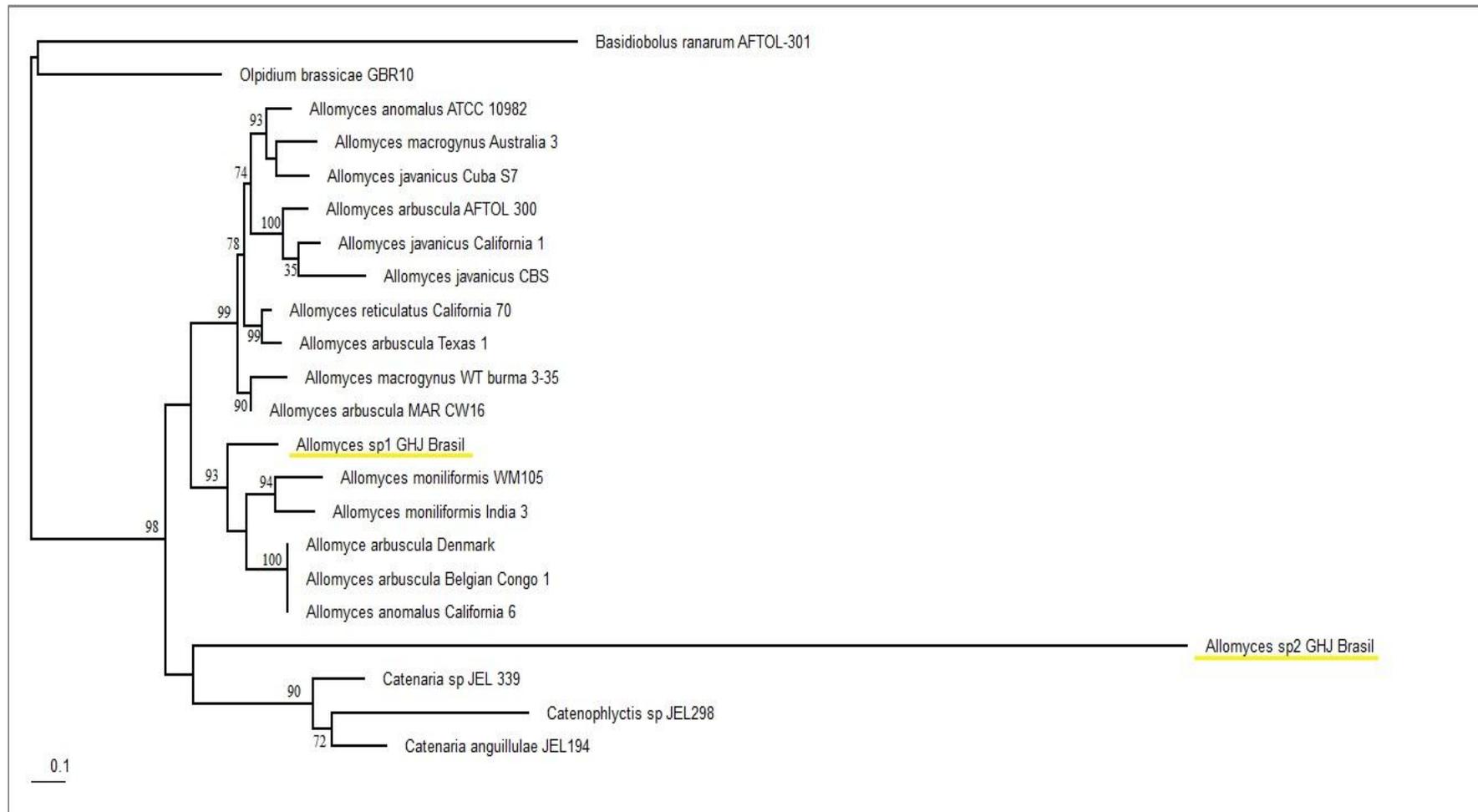


Figura 24. Análise de máxima verossimilhança da região ITS de isolados de Blastocladiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC).

### Análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança das regiões 18S (SSU) e 28S(LSU).

A árvore filogenética concatenada (SSU+LSU) de análise Bayesiana e máxima verossimilhança (Figura 25) foram realizadas com sequências de 31 fungos do GenBank, e duas sequências de isolados do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) Jesus *et al.* (2013), sendo duas espécies do gênero *Rozella* Cornu, selecionadas como “outgroup” (Tabela 3). Os resultados das análises de máxima verossimilhança e Bayesiana estão representadas na mesma árvore (Figura 25) por apresentarem a mesma topologia. Os isolados do PEIC estão mostrados separadamente na Tabela 4. O número de acesso no GenBank para as regiões 18S e 28S são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de acesso das sequências das regiões 18S e 28S selecionadas no GenBank. PEFI - sequências provenientes de estudo realizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga por Jesus *et al.* (2013).

Número da cultura/isolado	Ordem	Número de acesso GenBank	
		18S	28S
JEL347 <i>Rozella ex Rhizoclosmatium</i>	<i>Incertae sedis</i>	AY601707	DQ273766
UCB47-54 <i>Rozella allomycis</i>	<i>Incertae Sedis</i>	T.Y.James	T.Y.James
AFTOL19 <i>Physoderma maydis</i>	Blastocladales	AY601708	DQ273768
AFTOL18 <i>Coelomyces stegomyiae</i>	Blastocladales	AF322406	DQ273767
UCB49 <i>Blastocladiella emersonii</i>	Blastocladales	T.Y.James	T.Y.James
Brazil2 <i>Allomyces arbuscula</i>	Blastocladales	NG017766	T.Y.James
CR74 <i>Microallomyces</i> sp.	Blastocladales	AY635840	DQ273805
SA235 <i>Hyaloraphidium curvatum</i>	Monoblepharidales	NG017172	NG027646
CR84 <i>Oedogoniomyces</i> sp.	Monoblepharidales	AY349026	AY349057
JEL183 <i>Gonapodya</i> sp.	Monoblepharidales	AF164329	AY349059
JEL45 <i>Chytriumyces angularis</i>	Chytridiales	AF164253	DQ273815
JEL342 <i>Catenomyces</i> sp.	Blastocladales	AY635830	DQ273789
PLAUS21 <i>Rhizophyidium macroporum</i>	Rhizophydiales	T.Y.James	AY439040
JEL326 <i>Entophlyctis helioformis</i>	Chytridiales	AY635826	DQ273784
JEL197 <i>Batrachochytrium dendrobatidi</i>	Rhizophydiales	AF164301S1	NG027619

Número da cultura/isolado	Ordem	Número de acesso GenBank	
		18S	28S
ATCC48900 <i>Spizellomyces punctatus</i>	Spizellomycetales	NG017173	NG027618
JEL324 <i>Endochytrium</i> sp.	Cladochytriales	AY635844	DQ273816
<i>Nowakowskiella multispora</i> ALJ Brasil	Cladochytriales	PEFI	PEFI
JEL180 <i>Cladochytrium replicatum</i>	Cladochytriales	NG017169	AY546683
<i>Cladochytrium replicatum</i> ALJ Brasil	Cladochytriales	PEFI	PEFI
JEL93 <i>Karlingiomyces</i> sp.	Cladochytriales	AF164278	AY439069
JEL109 <i>Polychytrium aggregatum</i>	Cladochytriales	AY601711	AY439068
AFTOL634 <i>Synchytrium decipiens</i>	Chytridiales	DQ536475	DQ273819
AFTOL635 <i>Synchytrium macrosporum</i>	Chytridiales	DQ322623	DQ273820
JEL47 <i>Phlyctochytrium planicorne</i>	Chytridiales	DQ536473	AY439028
JEL221 <i>Rhizophyidium</i> sp.	Rhizophydiales	T.Y.James	DQ273834
WB228 <i>Cladochytrium polystomum</i>	Cladochytriales	KF711853	KF711852
NBRC195429 <i>Cladochytrium</i> sp.	Cladochytriales	AB586077	AB586082
JEL186 <i>Asterophlyctis sarcoptoides</i>	Chytridiales	AF164317	AY439070
MP4 <i>Chytrium hyalinus</i>	Chytridiales	DQ536487	DQ273836
JEL59 <i>Chytrium spinosus</i>	Chytridiales	AF164323	AY439073
JEL06 <i>Rhizoclosmatium globosum</i>	Chytridiales	AF164311	AY439061
JEL161 <i>Podochytrium</i> sp.	Chytridiales	AF164305	AY988517
GE13 <i>Neocallimastix</i> sp.	Neocallimastigales	DQ322625	DQ273822
SS218 <i>Olpidium brassicae</i>	<i>Incertae Sedis</i>	T.Y.James	T.Y.James

Para análise concatenada das regiões 18S e 28S de 2329 caracteres, o modelo de substituição nucleotídica selecionado foi Tamura 3 parâmetros com distribuição gama (TrN+G) (Tamura & Nei 1993). Entre os representantes do Filo Blastocladiomycota (Figuras 1-3), os dois táxons de *Allomyces* do PEIC (sp.1 e sp.2), formaram um grupo com altos valores de suporte (91/1.00) com *Allomyces arbuscula* Brazil2 e com *Microallomyces* sp. (CR74), tendo como grupo irmão *Blastocladiella emersonii* (UCB49-1). Já dentro de Chytridiomycota, *Rhizophyidium sphaerotheca* do PEIC, formou um grupo fortemente suportado (100/1.00), com outra espécie do gênero, *Rhizophyidium macroporosum* PLAUS21, embora a presença de *Entophlyctis helioformis* (Dang) Ramsb (JEL326 - Chytridiales) como grupo irmão, indique a necessidade de inclusão de mais sequências do gênero *Rhizophyidium* em outras análises. A espécie *Polychytrium aggregatum* Ajello do PEIC, formou um grupo com

altos valores de suporte (100/1.00), com o espécime *P. aggregatum* JEL109, tendo como grupo irmão *Karlingiomyces* sp. (JEL93), corroborando os dados de Letcher & Powell (2005a) e James *et al.* (2006a) e Longcore & Simmons (2012).

Tabela 4. Número dos táxons do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) na Coleção de culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt) e números de acesso no GenBank.

Táxon	Número CCIBt	Ordem	Número de acesso GenBank		
			18S	ITS1-5.8S-TS2	28S
<i>Allomyces</i> sp.1	4021	Blastocladales	KJ464405	KJ464406	KJ464407
<i>Allomyces</i> sp.2	4020	Blastocladales	KJ464416	KJ464417	KJ539150
<i>Cladochytrium tenue</i> Nowakowski	4013	Cladochytriales	KJ539144	KJ539145	KJ539146
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	4014	Cladochytriales	KJ464414	-, -	KJ464415
<i>Nowakowskiella multispora</i> Karling	4015	Cladochytriales	KJ539147	KJ539148	KJ539149
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello	4017	Cladochytriales	KJ464408	KJ464409	KJ464410
<i>Rhizophydium sphaerotheca</i> Zopf	4019	Rhizophydiales	KJ464411	KJ464412	KJ464413

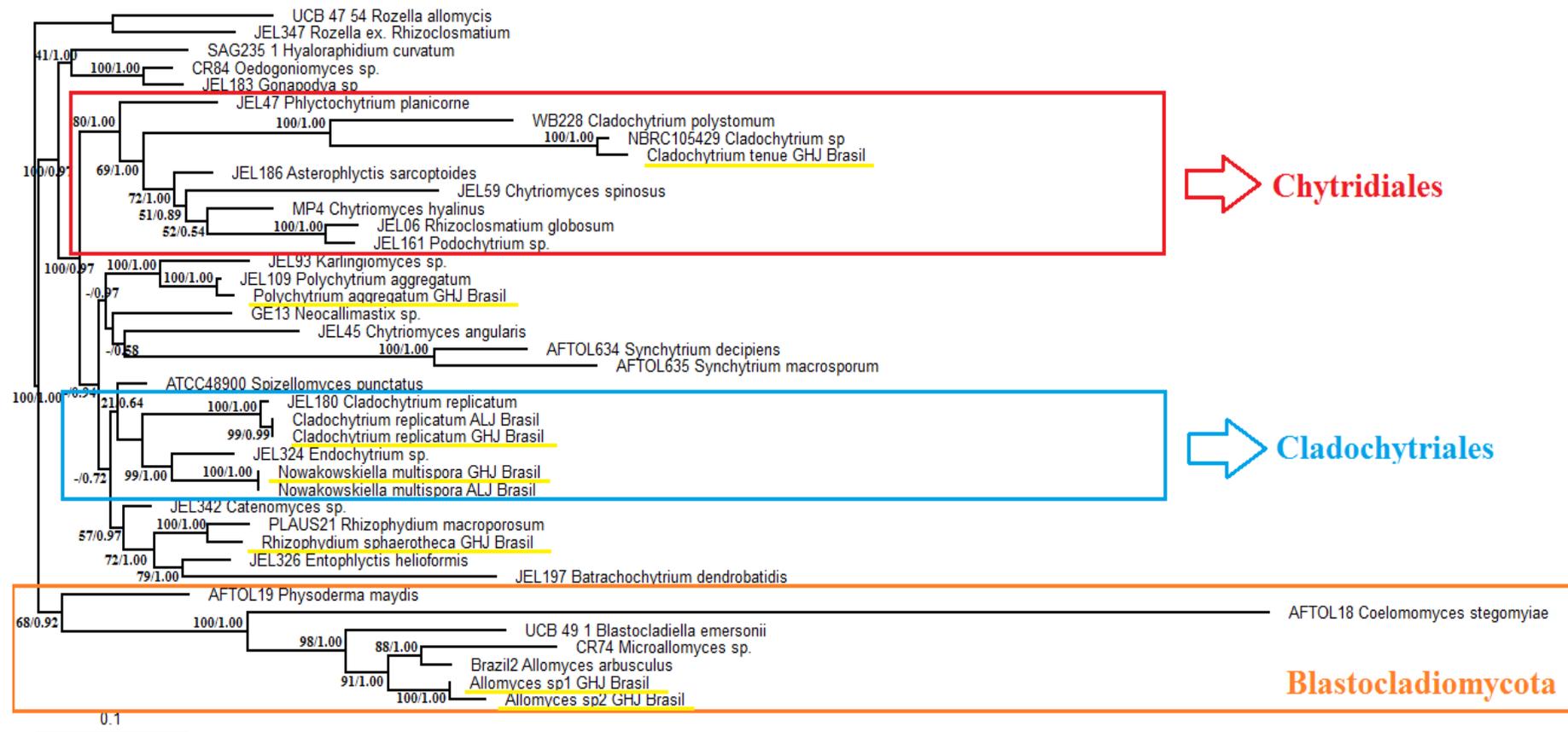


Figura 25. Análise de Máxima Verossimilhança/Bayesiana, mostrando o posicionamento dos isolados de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), destacados em amarelo. Os isolados com a identificação ALJ Brasil são provenientes do estudo de Jesus *et al.* (2013). Os valores de suporte são indicados máxima verossimilhança/Análise Bayesiana.

## Possíveis modificações taxonômicas e nomenclaturais nas ordens Chytridiales e Cladochytriales

Embora estudos de ultraestrutura dos zoósporos e informações complementares de outras regiões gênicas (RPB1) sejam ainda necessárias, a análise preliminar de dados concatenados (SSU+LSU) demonstrou que *Cladochytrium tenue* forma um clado com altos valores de suporte (100/1.00) com *C. polystomum* e *Cladochytrium* sp. NBRC, junto com *Asterophlyctis sarcoptoides* (JEL186), *Podochytrium* sp (JEL161), *Rhizoclosmatium globosum* (JEL06), *Chytriomycetes hyalinus* (MP4), *C. spinosus* (JEL59) e *Phlyctochytrium planicorne* (JEL57), classificados em outros estudos moleculares (Letcher & Powell 2005a, Letcher & Powell 2005b, James *et al.* 2006a) dentro da ordem Chytridiales sensu Barr (1980). Já os três diferentes espécimes de *Cladochytrium replicatum* Karling (JEL 180, ALJ e GHJ) formaram um clado fortemente suportado (99/1.00) junto às espécies de *Nowakowskiella multispora* (GHJ e ALJ) e *Endochytrium* sp. (JEL324), clados formalmente incluídos na ordem Cladochytriales de Mozley-Standridge (2009) (Figura 25). Se estes dados forem confirmados, a espécie *Cladochytrium replicatum* precisará ser renomeada, pois segundo o princípio da prioridade (artigo 11.3) contido no Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (McNeill *et al.* 2012), o nome do gênero deriva do nome da primeira espécie validamente publicada, no caso, *C. tenue*. E ainda, a nomenclatura taxonômica da ordem Cladochytriales S.E. Mozley-Standridge e da família Cladochytriaceae J. Schröt. precisará ser reavaliada, já que ambas são derivadas de *C. tenue*, pois a família Cladochytriaceae é constituída somente pelo gênero-tipo *Cladochytrium* Nowak., e a ordem Cladochytriales representada pela primeira família validamente publicada (Cladochytriaceae). Além das implicações nomenclaturais derivadas destas análises, existe ainda considerações morfológicas muito importantes

sobre a taxonomia clássica que é a presença de células turbinadas, considerada característica diagnóstica do gênero *Cladochytrium* (Nowakowski 1877), as quais se encontram compartilhadas em nossas análises, tanto nas espécies incluídas na ordem Cladochytriales (JEL180, GHJ, ALJ) como nas inseridas em Chytridiales (*Cladochytrium polystomum*, *Cladochytrium* sp NBRC e *C. tenue*). Isso pode ser indicativo de que esta estrutura não é um caráter filogeneticamente informativo, e pode ter aparecido várias vezes durante o processo evolutivo, similar ao concluído por James *et al.* (2006) com relação ao opérculo. Embora os resultados sejam preliminares, a utilização de duas regiões (SSU + LSU) confirmam fortemente nossas análises, visto que Steiger *et al.* (2011) transferiu *Cylindrochytridium johnstonii* para Cladochytriales, baseado em análises morfológicas e sequências parciais da região 28S (LSU), sem nenhuma análise ultraestrutural do zoósporos.

Por intermédio deste estudo foi realizado o cultivo e a disponibilização pela primeira vez de sequências de isolados brasileiros dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota no GenBank, bem como, discutido o posicionamento filogenético da espécie-tipo *Cladochytrium tenue*. Estes resultados aqui obtidos mostram sua grande relevância no cenário mundial ao indicar a segregação de *Cladochytrium tenue* da ordem Cladochytriales e as possíveis alterações nomenclaturais subsequentes.

### Referências bibliográficas

- Barr, D.J.S.** 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* 62: 1171-1201.
- Beneke, E.S., Rogers, A.L.** 1962. Aquatic Phycomycetes from the States of São Paulo, Minas Gerais e Paraná. *Rickia* 1: 181-193.
- Clements, F.E. & Shear, C.L.** 1931. *The genera of Fungi*. H.W. Wilson, New York.

- Gaertner, A.** 1954. Über das Vorkommen niederer Erdphycomyceten in Afrika, Schweden und an einigen mitteleuropäischen Standorten. Archiv für Mikrobiologie 21: 4-56.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O.** 2010. Seaview version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building . Molecular Biology and Evolution 27: 221-224.
- Hibbett, D., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M. et al.** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 3: 509-547.
- James, T.Y., Porter, D., Leander, C.A., Vilgalys, R. et al.** 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. Canadian Journal of Botany 78: 1-15.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E. et al.** 2006a. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) description of a new phylum (Blastocladiomycota). Mycologia 98: 860-871.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofseter et al.** 2006b. Reconstructing the early evolution of fungi using a six gene phylogeny. Nature 443: 818-822.
- Jesus, A.L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Hoehnea 40: 167-180.
- Karling, J.S.** 1945. Brazilian chytrids. V. *Nowakowskiella macrospora* sp. and other polycentric species. American Journal of Botany 32: 29-35.
- Karling, J. S.** 1977. Chytridiomycetarum Iconographia. Lubrecht & Cramer, Vaduz.
- Lamour, K. & Finley, L.** 2006. A strategy for recovering high quality genomic DNA from a large number of *Phytophthora* isolates. Mycologia 98: 514-517.

- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2005a. Phylogenetic position of *Phlyctochytrium planicorne* (Chytridiales, Chytridiomycota) based on zoospore ultrastructure and partial nuclear LSU rRNA gene sequence analysis. *Nova Hedwigia* 80: 135-146.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2005b. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* 80: 115-133.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Churchill, P.F. & Chambers, J.G.** 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, of *Rhizophydiales* (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898-915.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Barr, D.J.S., Churchill, P.F. et al.** 2008a. Rhizophlyctidiales – a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research* 112: 1031-1048.
- Letcher, P.M., Vélez, C.G., Barrantes, M.E., Powell, M.J., et al.** 2008b. Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. *Mycological Research* 112: 759-782.
- Longcore, J.E.**, 1995. Morphology and zoospore ultrastructure of *Entophlyctis luteolus* sp. nov. (Chytridiales): Implications for chytrid taxonomy. *Mycologia* 87: 25-33.
- Longcore, J.E. & Simmons, R.D.** 2012. The Polychytriales ord. nov. contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. *Mycologia* 104: 276-294.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V. et al.** 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Koeltz Scientific Books, Bratislava.
- Mozley-Standridge, S.E., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Porter, D. et al.** 2009. Cladochytridiales - a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research*. 113: 498-507.

- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2009. Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23: 459-473.
- Nascimento, C.A., Gomes, E.P.C., de Souza, J.I. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2012. Zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles assembles from soil of Brazilian Cerrado areas. *Fungal Ecology* 5: 114-123.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B. Jr.** 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Available in: [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Nowakowskii, L.** 1877. Beitrag zur Kenntniss der Chytridiaceen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2: 73-100.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* 7: 309-329.
- Rocha, J.R.S.** 2002. Fungos zoospóricos em área de cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Sparrow, F.K.** 1943. The aquatic Phycomycetes exclusive of the Saprolegniaceae and *Pythium*. University Michigan Press, Ann Arbor.
- Sparrow, F.K.** 1960. Aquatic Phycomycetes. University of Michigan Press. 2<sup>a</sup> ed. Ann Arbor.
- Sparrow, F.K.** 1968. Ecology of freshwater Fungi *in* The Fungi, Academic Press. New York.
- Steiger, R.A., Simmons, D.R. & Longcore, J.E.** 2011. *Cylindrochytridium johnstonii* is a member of Cladochytriales. *Mycotaxon* 118: 293-302.

- Souza, J.I., Schoenlein-Crusius, I.H., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Schoenlein, N.C.** 2008. Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) R.L.Seym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes). Acta Botanica Brasilica 22: 271-223.
- Tamura, K. & Nei, M.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. Molecular Biology Evolution 10: 512-526.
- Velez, C.G., Letcher, P.M., Schultz, S., Mataloni, G. et al.** 2013. Three new genera in Chytridiales from aquatic habitats in Argentina. Mycologia 105: 1251-1265.
- Vilgalys, R.** 2013. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. Available from: [www.biology.duke.edu](http://www.biology.duke.edu)
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J (eds.), PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York.

## Considerações finais

De modo geral, a comunidade de fungos zoospóricos encontrada, durante o período de estudo no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), se mostrou diversificada, tendo sido representadas as ordens Blastocladales, Chytridiales, Cladochytriales, Rhizophydiales e Monoblepharidales, dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota. Representantes do filo Chytridiomycota foram predominantes, tanto em água como em solo, mostrando sua presença e importância nos ambientes aquáticos e terrestres. Para comparar os dois compartimentos, o índice de similaridade de Sørensen foi calculado por meio da fórmula  $SI = [2c/(a+b)] \times 100$ , onde “c” representa o número de táxons comuns aos dois compartimentos, “a” número de táxons na água e “b” número de táxons no solo (Müller-Dombois & Elleberg 1974). Com exceção de *Chytrium lucidus* Karling, citado pela primeira vez para o Brasil, todos os outros táxons identificados foram anteriormente citados para o país.

A riqueza total dos táxons presentes nos dois compartimentos (água e solo) foi representada por 34 táxons (Tabela 1). Destes, 31 pertencem ao filo Chytridiomycota e apenas três ao Filo Blastocladiomycota. A ordem Chytridiales foi a melhor representada, com 19 táxons e 56% da riqueza total de espécies. A abundância total foi representada por 256 isolados, dos quais 112 foram registrados em água e 144 em solo, evidenciando a maior ocorrência e distribuição destes fungos em ambientes terrestres, considerados mais estáveis e com maior quantidade de matéria orgânica que os aquáticos. *Cladochytrium tenue*, *Cladochytrium replicatum*, *Karlingiomyces granulatus*, *Septochytrium* sp., *Chytrium appendiculatus*, *C. spinosus*, *Polychytrium aggregatum*, *Entophlyctis luteolus* foram os táxons mais abundantes, enquanto *Allomyces* sp 1, *Allomyces* sp.2, *Phlyctochytrium furcatum*, *P. mucronatum*,

*Entophlyctis lobata* e *Gonapodya prolifera* ocorreram somente uma vez ao longo de período de estudo (Tabela 1). Observou-se preferência de determinados táxons aos compartimentos, sendo *Chytrium hyalinus*, *C. spinosus*, *Phlyctochytrium furcatum*, *Entophlyctis lobata*, *Diplophlyctis intestina*, *D. sarcoptoides*, *Nowakowskiella hemisphaerospora*, *N. multispora*, *Gonapodya prolifera*, encontrados exclusivamente em água, enquanto *Allomyces* sp.1, *Allomyces* sp.2, *Chytrium lucidus*, *Phlyctochytrium mucronatum*, *Rhizidium verrucosum*, *Septosperma rhizophydii*, *Entophlyctis* sp, *Septochytrium* sp., *Rhizophydium sphaerotheca* e *R. stipitatum* exclusivamente em solo. Quinze táxons (44%) ocorreram nos dois compartimentos (Tabela 1).

Tabela 1. Abundância e riqueza total dos táxons encontrados nas amostras de água e solo no Parque Estadual da Ilha do Cardoso de Agosto/2012 a Junho/2013.

Táxons/Compartimentos	Abundância		Total
	Água	Solo	
FILO BLASTOCLADIOMYCOYA			
BLASTOCLADIOMYCETES			
BLASTOCLADIALES			
BLASTOCLADIACEAE			
<i>Allomyces</i> sp.1	0	1	1
<i>Allomyces</i> sp.2	0	1	1
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling	6	1	7
FILO CHYTRIDIOMYCOTA			
CHYTRIDIOMYCETES			
CHYTRIDIALES			
CHYTRIDIACEAE			
<i>Chytrium appendiculatus</i> Karling	11	5	16
<i>C. hyalinus</i> Karling	3	0	3
<i>C. spinosus</i> Fay	16	0	16
<i>C. lucidus</i> Karling	0	4	4
<i>Karlingiomyces dubius</i> (Karling) Sparrow	2	7	9
<i>K. granulatus</i> (Karling) Sparrow	1	18	19
<i>Karlingiomyces</i> sp.	2	8	10
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello	1	5	6
<i>P. furcatum</i> Sparrow	1	0	1

Táxons/Compartimentos	Abundância		Total
	Água	Solo	
<i>P. mucronatum</i> Canter	0	1	1
<i>Rhizidium verrucosum</i> Karling	0	2	2
<i>Septosperma rhizophydii</i> Whiffen ex W.H. Blackw. & M.J. Powell	0	7	7
ENDOCHYTRIACEAE			
<i>Entophlyctis luteolus</i> Longcore	2	11	13
<i>E. lobata</i> Willoughby & Towley	1	0	1
<i>Entophlyctis</i> sp.	0	2	2
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma	2	1	3
<i>D. complicata</i> (Willoughby) Dogma	1	2	3
<i>D. intestina</i> (Schenk) J. Schröter.	4	0	4
<i>D. sarcoptoides</i> (H.E. Petersen) Dogma	2	0	2
CLADOCHYTRIALES			
CLADOCHYTRIACEAE			
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	19	3	22
<i>C. tenue</i> Nowak.	11	17	28
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello	10	5	15
INCERTAE SEDIS			
<i>Catenochytridium</i> sp	1	2	3
NOWAKOWSKIELLACEAE			
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i> Shanor	5	0	5
<i>N. multispora</i> Karling	9	0	9
SEPTOCHYTRIACEAE			
<i>Septochytrium</i> sp.	0	17	17
RHIZOPHYDIALES			
RHIZOPHYDIACEAE			
<i>Rhizophydium coronum</i> Hanson	1	5	6
<i>R. elyense</i> Sparrow	1	5	6
<i>R. sphaerotheca</i> Zopf	0	8	8
<i>R. stipitatum</i> Sparrow	0	4	4
MONOBLEPHARIDOMYCETES			
MONOBLEPHARIDALES			
GONAPODYACEAE			
<i>Gonapodya prolifera</i> (Cornu) Fischer	1	0	1
<b>Riqueza</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>34</b>
<b>Abundância</b>	<b>112</b>	<b>144</b>	<b>256</b>

Apesar das condições abióticas particulares de cada compartimento, não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores dos índices biológicos de riqueza, diversidade de Shannon ( $H'$ ), dominância de Simpson ( $D$ ) e equitatividade ( $E$ ) (Tabela 3). A diversidade total ( $H' = 3,14$ ;  $D = 0,05$ ;  $E = 0,85$ ), além do valor da

similaridade de Sørensen (61,2%) para água e solo, são indicativos de uma micota bastante diversa e com poucos táxons dominantes, como ressaltado por Nascimento *et al.* (2011, 2012), evidenciando a importância de esforço amostral quando da determinação dos locais e periodicidade de coleta.

Tabela 2. Índices biológicos de riqueza, diversidade de Shannon, dominância de Simpson e equitatividade, nos compartimentos água e solo, durante o período de estudo.

Índices	Água	Solo	Total
Riqueza (S)	24a	25a	34
Shannon (H')	2,3a	2,6a	3,14
Simpson (D)	0,1a	0,1a	0,05
Equitatividade	0,8a	0,9a	0.85

Considerando o atual estado de impactação de áreas de Mata Atlântica, exaustivamente citada em literatura, e a escassez de estudos taxonômicos e moleculares com os fungos zoospóricos no Brasil, este trabalho indica seu pioneirismo por mostrar pela primeira vez, a diversidade de fungos zoospóricos no PEIC, bem como, por contribuir com dados moleculares de cerca de 24% dos táxons identificados neste estudo, disponibilizando pela primeira vez sequências (regiões SSU, ITS e LSU) de isolados brasileiros no GenBank.. Além disso, o posicionamento da espécie-tipo *Cladochytrium tenue*, dentro da ordem Chytridiales, por meio das análises filogenéticas, traz importantes implicações e considerações taxonômicas e nomenclaturais para a ordem Cladochytriales.

## Referências bibliográficas

- Müeller-Dombois, D. & Ellenberg, H.** 1974. Mathematical treatment of vegetation data. *In: Aims and methods of vegetation ecology*. New York: John Wiley & Sons, p. 211-302.
- Nascimento, C.A., Gomes, E.P.C. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2011. Occurrence and distribution of zoosporic organisms in water bodies from Brazilian Cerrado. *Mycologia* 103: 261-272.
- Nascimento, C.A., Gomes, E.P.C., de Souza, J.I. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2012. Zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles assembles from soil of Brazilian Cerrado areas. *Fungal Ecology* 5: 114-123.