

GUSTAVO HENRIQUE JERÔNIMO ALVES

**ANÁLISE TAXONÔMICA, MOLECULAR, ECOLÓGICA E/OU
ULTRAESTRUTURAL DOS FILOS BLASTOCLADIOMYCOTA,
CHYTRIDIOMYCOTA E OOMYCOTA DE RESERVATÓRIOS DA BACIA
HIDROGRÁFICA DO SOROCABA/MÉDIO TIETÊ, ESTADO DE SÃO PAULO,
BRASIL**

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

SÃO PAULO, 2018

GUSTAVO HENRIQUE JERÔNIMO ALVES

**ANÁLISE TAXONÔMICA, MOLECULAR, ECOLÓGICA E/OU ULTRAESTRUTURAL
DOS FILOS BLASTOCLADIOMYCOTA, CHYTRIDIOMYCOTA E OOMYCOTA DE
RESERVATÓRIOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO SOROCABA/MÉDIO TIETÊ,
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

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

ORIENTADORA: DRA CARMEN LIDIA AMORIM PIRES ZOTTARELLI

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

Alves, Gustavo Henrique Jerônimo

A474a Análise taxonômica, molecular, ecológica, e/ou ultraestrutural dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota de reservatórios da Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil / Gustavo Henrique Jerônimo Alves -- São Paulo, 2018.
150p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.
Bibliografia.

1. Ecologia. 2. Fungos zoospóricos. 3. Ultraestrutura dos zoósporos. I. Título.

CDU: 582.281

*À minha esposa e amiga, Carolina
Celestino Jerônimo Alves. Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

Em especial à Dra. Carmen L.A. Pires Zottarelli, pela confiança em mim depositada nesses seis anos de convivência, e principalmente pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e paixão pelo que faz.

Agradeço também, a minha esposa Carolina, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando e incentivando em novos desafios e conquistas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de Doutorado (nº processo FAPESP - 2014/16358-4) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE nº processo FAPESP – 2016/25800-8), as quais me permitiram crescer como profissional.

À Dra. Carla Ferragut, do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica, pelo inestimável auxílio com as análises estatísticas e tratamento dos dados abióticos e bióticos, sempre muito solícita e de bom humor.

À Dra. Denise Bicudo, do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica, por todo incentivo inicial e suporte durante todo o período de estudo.

À Ana Lucia de Jesus, pela convivência e ajuda durante todo este período, sendo sempre um exemplo de dedicação e trabalho duro.

À Vivis, Richi, Danilo, Luiz, Marcela, Sarah, Alex, Mauro, Nelson e Mari, pelo ótimo ambiente de trabalho, conversas ao café e ajuda durante o desenvolvimento da tese.

Ao Stefano Zorzal (Jean), pelo apoio durante as coletas e análises laboratoriais, e cervejas compartilhadas.

À Samantha, Elaine e Dorinha por toda ajuda durante as expedições de coleta, sempre muito dispostas a me ajudar em todas as etapas desde a amostragem até o tratamento das amostras coletadas.

À Pós-graduação do Instituto de Botânica (PG-IBt), por todo apoio institucional e infraestrutura fornecida para desenvolvimento deste projeto de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado fornecida durante o primeiro ano de projeto.

Ao Dr. Timothy Y. James (Tim) e University of Michigan por todo suporte, respeito e confiança depositados durante o período de estágio, o qual foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Rabern Simmons, do laboratório de “Ecology and Evolutionary Biology” da “University of Michigan”, pelos ensinamentos sobre as análises de ultraestrutura dos zoósporos e pela amizade construída.

À Anat e Erik, por toda paciência e disposição em ajudar em todos os aspectos, sendo primordiais na minha adaptação, principalmente nas semanas iniciais, sempre dispostos a ajudar em qualquer situação.

À William Davis, Alisha, Jill, Lucas, Rob, Kevin and Buck pela agradável convivência e respeito demonstrado durante os 6 meses de estágio na “University of Michigan”.

Ao Instituto Chico Mendes de preservação da Biodiversidade (ICM-Bio), pela permissão de coleta de amostras de água e sedimento no reservatório Hedberg, localizado na Floresta Nacional de Ipanema (FLONA de Ipanema), município de Iperó.

Ao grupo Votorantim, pelo suporte técnico e permissão de coleta de amostras de água e sedimento nos reservatórios de Santa Helena e Itupararanga.

A todos que de certa forma tornaram possível a realização deste estudo.

Lista de siglas

APA – Área de Proteção Ambiental

BEPE – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior

CBA – Companhia Brasileira de Alumínio

CBH-SMT – Conselho da Bacia Hidrográfica Sorocaba e Médio Tietê

CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CCIBt – Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias

DDSA – anidrido dodecenil-succínico

DMP 30 – Tris-Dimetilaminometil fenol

DMSO – Dimetilsulfato

EMS[®] – *Electron Microscopy Sciences*

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo

FLONA de Ipanema – Floresta Nacional de Ipanema

IBAMA: Instituto Nacional do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis e da Amazônia Legal

IET – Índice de Estado Trófico

NT – Nitrogênio Total

OD – Oxigênio dissolvido

PCA – Análise de Componentes Principais

PCoA – Análise de Coordenadas Principais

PEFI – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

PFLA – Análise de Ácidos Graxos Fosfolipídicos

PT – Fósforo Total

SigRH – Sistema de Gerenciamento de Recursos Hídricos

UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

UrAc – Acetato de Uranila

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	viii
RESUMO	09
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO GERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
HIPÓTESES	19
METODOLOGIA GERAL	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO 1. Estrutura da comunidade de organismos zoospóricos heterotróficos (fungos zoospóricos e oomicetos) da coluna d'água e sedimento superficial de reservatórios com distintos estados tróficos

Resumo	56
Abstract	57
Introdução	59
Material e Métodos	62
Resultados & Discussão	65
Referências Bibliográficas	90

CAPÍTULO 2. Novelties for the *Nowakowskiella* genus: a new species and new combination

Abstract	97
Introduction	97
Material and Methods	99
Results	103
Discussion	110
Literature cited	112

CAPÍTULO 3. *Boothiomycetes angulosum*: a new combination into Terramycetaceae (Rhizophydiales, Chytridiomycota)

Abstract	116
Introduction	117
Material and Methods	118
Results	121
Discussion	126
References	129

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Anexo I	132
Anexo II	134
Anexo III	142
Apêndice I	150

APRESENTAÇÃO

A tese intitulada “**Análise taxonômica, ecológica, molecular e/ou ultraestrutural dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota de reservatórios da Bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê, estado de São Paulo, Brasil**”, foi estruturada em três capítulos, os quais são precedidos por uma **INTRODUÇÃO GERAL, OBJETIVOS ESPECÍFICOS, HIPÓTESES E METODOLOGIA GERAL**.

O **CAPÍTULO 1** aborda a diversidade de Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota na coluna d’água e sedimento superficial, de três reservatórios da Bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê, com distintos estados tróficos. Os padrões de ocorrência e abundância desses grupos de organismos foram relacionados às flutuações sazonais e aos diferentes fatores abióticos mensurados na coluna d’água e sedimento superficial. As análises moleculares, neste contexto, foram utilizadas para corroborar as identificações morfológicas.

O **CAPÍTULO 2**, elaborado de acordo com as normas da revista *Mycologia*, trata-se de um estudo taxonômico e filogenético (análise combinada das regiões 18S, 5,8S e 28S do rDNA) de representantes da ordem Cladochytriales, com especial enfoque no gênero *Nowakowskiella* J. Schröt., para o qual foi descrito uma nova espécie nomeada como *Nowakowskiella crenulata* Jerônimo & Pires-Zottarelli, e proposto um novo gênero, *Karlingiella* Jerônimo, Jesus & Pires-Zottarelli, considerando o posicionamento filogenético de *Nowakowskiella elongata* Karling como grupo irmão do gênero *Cladochytrium* Nowak.

O **CAPÍTULO 3**, elaborado de acordo com as normas da revista *Nova Hedwigia*, inclui uma discussão morfológica, filogenética e ultraestrutural (baseado na ultraestrutura dos zoósporos) da espécie *Rhizophydium angulosum* Karling, para a qual foi proposta uma nova combinação (*Boothiomyces angulosum* (Karling) Jerônimo & Pires-Zottarelli). Além disso, discutimos também a morfologia e posicionamento filogenético da espécie *Rhizophydium elyense* Sparrow.

RESUMO GERAL

A bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê (UGRHI 10) está situada na região Centro-Sudeste do Estado de São Paulo, uma das mais desenvolvidas do interior do estado. Nesta região, devido à crescente demanda por energia elétrica e abastecimento público, diversos reservatórios foram criados, os quais estão sujeitos aos efeitos de ações antrópicas locais. Dentre os impactos detectados estão a eutrofização e o uso desordenado do solo, fatores que estão associados à perda da qualidade da água e da biodiversidade. Representantes dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota (fungos zoospóricos) e do filo Oomycota, importantes agentes decompositores e parasitas, são pouco explorados nestes ambientes aquáticos, existindo a necessidade de uma melhor compreensão do papel destes organismos nos processos de transferência de energia nesses ecossistemas. Diante disso, o objetivo deste estudo foi relacionar a riqueza e a abundância destes grupos de organismos com a sazonalidade e alguns fatores abióticos mensurados na coluna d'água e sedimento superficial de três reservatórios brasileiros (Santa Helena, Itupararanga e Hedberg), inseridos na UGRHI 10, conhecidamente com distintos estados tróficos. Além disso, disponibilizar sequências gênicas dos espécimes identificados em nível específico e construir filogenias, confirmando ou rejeitando hipóteses filogenéticas dentre os representantes de Chytridiomycota, por meio da análise da ultraestrutura dos zoósporos destes fungos. Para isso, foram realizadas quatro coletas em cada reservatório, onde foram mensuradas algumas variáveis físicas e químicas da água (temperatura, pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, nitrogênio e fósforo total) e do sedimento superficial (nitrogênio total, fósforo total e carbono orgânico total). A estrutura da comunidade foi avaliada considerando-se a ocorrência, frequência e abundância dos táxons, mediante cálculo da riqueza de espécies, do índice de diversidade de Shannon, do índice de dominância de Simpson, da equitatividade e do índice de similaridade de Sørensen. Durante o estudo, 52 táxons destes organismos zoospóricos heterotróficos foram identificados, sendo 25 deles representantes dos fungos zoospóricos e 27 de oomicetos. Dentre os fungos zoospóricos, uma nova espécie do gênero *Nowakowskiella* J. Schröt foi descrita e o gênero *Avachytrium* Velez & Letcher relatado pela primeira vez para o Brasil, assim como *Plectospora gemmifera* Drechsler a foi dentre os oomicetos. No total, 102 sequências das regiões 18S, ITS, 28S, RPB1, RPB2 e COXI foram obtidas durante o estudo, considerando os dois grupos de organismos, as quais representam 25 táxons, dentre os quais, *Nowakowskiella ramosa* Butler, uma nova espécie nomeada como

Nowakowskiella crenulata Jerônimo & Pires-Zottarelli, *Rhizophydium angulosum* Karling (para o qual está sendo proposta uma nova combinação) e *Plectospira gemmifera* Drechsler, todos inseridos pela primeira vez em análises filogenéticas. Foi observada uma comunidade diversa com poucos táxons dominantes, sendo a maior parte deles observada na estação chuvosa, com *Cladochytrium replicatum* Karling, *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor, *Aphanomyces* spp., *Dictyuchus* spp. e *Pythium* dos grupos P e T, sendo os táxons mais frequentes e abundantes, considerando os reservatórios e estações (seca e chuvosa). Os organismos zoospóricos estudados apresentaram uma ampla distribuição ao longo de diferentes gradientes tróficos, existindo táxons estritamente relacionados aos locais com as mais altas concentrações de nitrogênio e fósforo total, e outros aos locais com as mais baixas concentrações destes nutrientes, e que potencialmente poderiam ser indicativos da qualidade das águas. Concluimos, portanto, que estes organismos zoospóricos heterotróficos são, geralmente, tolerantes às amplas variações nas concentrações de nitrogênio e fósforo, mas alguns táxons são limitados pela disponibilidade destes nutrientes, particularmente o fósforo.

Palavras-chave: diversidade, ecologia, filogenia, fungos zoospóricos, oomicetos, ultraestrutura dos zoósporos.

ABSTRACT

The “Sorocaba/Médio Tietê” hydrographic basin (UGRHI 10) is located in the Center-Southeast region of the São Paulo state, one of the most developed regions of the state. In this region, due to the growing demand for electricity and public supply, several reservoirs were built, which are subject to the effects of local anthropogenic actions. Among the detected impacts the eutrophication and disorderly use of the land are factors that are associated with the loss of water quality and biodiversity. Blastocladiomycota, Chytridiomycota (zoosporic fungi) and Oomycota, important decomposing agents and parasites, are poorly explored in these aquatic environments and additional studies are necessary to clarify the role of these organisms in the energy transfer processes in these ecosystems. Considering this, the aim of this study was to relate the species richness and abundance of these groups with seasonality and some abiotic factors measured in the water column and surface sediment of three Brazilian reservoirs (Santa Helena, Itupararanga and Hedberg), located in UGRHI 10, with distinctive trophic states. In addition, we also intend to provide gene sequences of the specimens identified at specific level and build their phylogeny, confirming or rejecting phylogenetic hypotheses to the Chytridiomycota representatives, through zoospore ultrastructural analysis. In order to do this, four sampling were performed in each reservoir, in which physical and chemical variables of the water (temperature, pH, electrical conductivity, dissolved oxygen, nitrogen and total phosphorus) and surface sediment (total nitrogen, total phosphorus and total organic carbon) were measured. The community structure was evaluated considering the abundance, frequency, species richness, Shannon’s diversity index, Simpson’s index, Evenness and similarity Sorensen index. During the study, 52 taxa of heterotrophic zoosporic organisms were identified, 25 of which representative of Blastocladiomycota and Chytridiomycota phyla (zoosporic fungi) and 27 of Oomycota phylum. On the zoosporic fungi, a new species of the *Nowakowskiella* J. Schröt genus was described and *Avachytrium* Velez & Letcher reported for the first time in Brazil, as well as *Plectospora gemmifera* Drechsler to the Oomycota. In total, 102 sequences from the 18S, ITS, 28S, RPB1, RPB2, and COXI regions were obtained during the study, considering the two groups of organisms, which represent 25 taxa, being *Nowakowskiella ramosa* Butler, the new species *Nowakowskiella crenulata* Jerônimo & Pires-Zottarelli, *Rhizophyidium angulosum* Karling (for which we are proposing a new combination) and *Plectospora gemmifera* Drechsler included for first in phylogenetic analyzes. We observed a diverse

community with few dominant taxa, which occurred predominantly at rainy season, being *Cladochytrium replicatum* Karling, *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor, *Aphanomyces* spp., *Dictyuchus* spp. and *Pythium* group P and T, the most frequent and abundant, considering the reservoirs and seasons (dry and rainy). Zoosporic organisms presented a wide distribution along different trophic gradients, with species strictly related to locals with high concentrations of nitrogen and total phosphorus, and others with low concentrations of these nutrients, which could potentially be taxa indicative of quality of water. We conclude that heterotrophic zoosporic organisms are, in general, tolerant to wide variations in nitrogen and phosphorus concentrations, but some taxa are limited by the availability of these nutrients, particularly phosphorus.

Key words: diversity, ecology, phylogeny, oomycetes, zoosporic fungi, zoospore ultrastructure.

INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos zoospóricos heterotróficos dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota possuem como similaridade a produção de esporos flagelados (zoósporos), os quais os permitem se dispersarem ativamente em ecossistemas aquáticos e terrestres úmidos. Nestes ambientes, esses organismos atuam como decompositores de matéria orgânica ou como parasitas de diferentes grupos de hospedeiros, exercendo assim um importante papel na ciclagem do carbono (Shearer *et al.* 2007, Sime-Ngando *et al.* 2011, Wurzbacher *et al.* 2016).

Blastocladiomycota e Chytridiomycota são filos incluídos no reino Fungi, cujos representantes possuem esporos com um único flagelo liso, posteriormente inserido, ocupando posicionamento basal na árvore filogenética dos fungos (James *et al.* 2006, Hibbett *et al.* 2007). Chytridiomycota conta com aproximadamente 706 espécies distribuídas atualmente em nove ordens (Chytridiales, Cladochytriales, Lobulomycetales, Polychytriales, Rhizophlyctidales, Rhizophydiales, Mesochytriales, Gromochytriales e Spizellomycetales), as quais estão inseridas na Classe Chytridiomycetes (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). Já Blastocladiomycota, filo criado a partir de Blastocladales (ordem que anteriormente pertencia ao Filo Chytridiomycota), possui uma única classe, Blastocladiomycetes, e é composto por 179 espécies (Kirk *et al.* 2008), cujos representantes divergiram do clado dos Chytridiomycota e são considerados grupo irmão juntamente com Zygomycota, Glomeromycota e *Olpidium* (James *et al.* 2006).

Representantes dos filos de fungos zoospóricos existem na Terra há pelo menos 400 milhões de anos como indicado por registros fósseis do baixo Devoniano (Taylor *et al.* 1992, Remy *et al.* 1994) e são considerados de crucial importância nos processos de decomposição e parasitismo nos ecossistemas aquáticos, onde são frequentemente observados como parasitas de algas, cianobactérias, macrófitas, invertebrados, anfíbios, fungos e oomicetos (Shearer *et al.* 2007, Sime-Ngando *et al.* 2012) e como sapróbios em material orgânico particulado e dissolvido oriundos de fontes alóctones e autóctones (Kagami *et al.* 2004). Embora a maioria das espécies conhecidas seja decompositora de celulose, queratina e quitina (Powell 1993), algumas se destacam como importantes parasitas de plantas de interesse econômico, como por exemplo, *Physoderma maydis* (Miyabe) Miyabe que causa mancha marrom do milho e *Synchytrium endobioticum* (Schilberszky) Percival 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 dessas populações (Gleason *et al.* 2010). Gerphagnon *et al.* (2013) relataram a presença de quitrídias parasitas de cianobactérias em eventos de florações e evidenciaram o papel das mesmas na fragmentação mecânica dos filamentos das cianobactérias, contribuindo assim, para o declínio destes eventos. *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols 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 ainda sido descrita outra espécie para o gênero, *Batrachochytrium salamandrivoras* Martel, a qual foi encontrada parasitando populações de *Salamandra salamandra* Lineus (salamandras de fogo) na Holanda (Martel *et al.* 2013).

A classificação e as relações filogenéticas dos representantes dos fungos zoospóricos (Blastocladiomycota e Chytridiomycota) vem passando por constantes reestruturações tendo em vista as características ultraestruturais dos zoósporos e dados de sequências genicas (James *et al.* 2000, 2006a, Letcher *et al.* 2008, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Longcore e Simmons 2012). O primeiro estudo de microscopia eletrônica de fungos zoospóricos mostrou o incrível potencial da arquitetura ultraestrutural como ferramenta para entendimento das relações evolutivas destes fungos (Koch 1961). Sua aplicação direta na reclassificação de Chytridiomycota foi inicialmente proposta por Barr (1980), o qual segregou Spizellomycetales de Chytridiales. Posteriormente Li *et al.* (1993), também apoiados em dados ultraestruturais, transferiram os representantes poliflagelados encontrados no rúmen de herbívoros de Spizellomycetales para Neocallimastigales. Paquin *et al.* (1997), analisando genes mitocondriais, transferiram Harpochytriaceae de Chytridiales (*sensu* Barr 1980) para Monoblepharidiales. James *et al.* (2000), ao proporem que as análises filogenéticas corroboravam as modificações taxonômicas indicadas pelos dados ultraestruturais, aliaram essas duas ferramentas e confirmaram a polifilia de Chytridiales e a divergência de Blastocladias de Chytridiales (James *et al.* 2006). Com isso, as ordens Blastocladias e Neocallimastigales foram elevadas a filo, Blastocladiomycota (James *et al.* 2006) e Neocallimastigomycota, respectivamente, e os representantes de Monoblepharidiales para Monoblepharidomycetes, sendo então o filo Chytridiomycota redefinido (Hibbet *et al.* 2007). Embora as análises moleculares e ultraestruturais estejam constantemente

reconfigurando a classificação dentro de Blastocladiomycota e Chytridiomycota, estudos com este enfoque na América do Sul podem ser resumidos ao de Velez *et al.* (2013) para a Argentina, no qual foram descritos três novos gêneros, não havendo, no entanto, nenhum estudo desta natureza no Brasil.

Já os representantes de Oomycota, apesar de serem também organismos possuidores de esporos flagelados, estão inseridos no Reino Straminipila, pois apresentam características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que os distinguem dos fungos (Alexopoulos *et al.* 1996, Beakes *et al.* 2014). Ainda hoje, estes organismos têm sido estudados por micologistas, especialmente por ocuparem os mesmos nichos que os fungos e por já terem sido classificados como tal (Sparrow 1960). Há dentre eles representantes sapróbios, os quais são considerados importantes elementos na degradação e ciclagem de nutrientes nos ecossistemas e também espécies parasitas de algas, peixes, crustáceos, plantas, fungos, mamíferos (incluindo o homem). Alguns gêneros de Oomycota, como por exemplo, *Achlya*, *Aphanomyces* e *Saprolegnia*, possuem espécies que podem parasitar peixes e seus ovos, e em *Pythium* e *Phytophthora* se encontram muitas espécies fitopatógenas (Alexopoulos *et al.* 1996). *Pythium insidiosum* tem se destacado como importante parasita de vertebrados, causando pitiose em equinos, bovinos, caprinos, cães, gatos e no homem (Alexopoulos *et al.* 1996), com relatos da espécie no Brasil, especialmente na região sul (Santurio *et al.* 1998, Leal *et al.* 2001, Bosco *et al.* 2005). Recente relato de *Pythium aphanidermatum* na espécie humana no Afeganistão revela o quão oportunistas estes organismos podem ser (Calvano *et al.* 2011).

Mesmo diante da expressiva frequência e importância destes organismos zoospóricos, que chamaremos ao longo do texto de fungos zoospóricos (Blastocladiomycota e Chytridiomycota) e oomicetos (Oomycota), nos processos de transferência de energia nos ecossistemas aquáticos, estudos abordando sua diversidade e importância em reservatórios do Brasil ainda são escassos e restritos ao estado de São Paulo, podendo ser resumidos aos trabalhos de Rocha & Merighi (1986) na Represa Billings, Pires-Zottarelli (1990) na Represa do Lobo, Rocha & Pires-Zottarelli (2002) na Represa do Guarapiranga e Rocha (2004) nos Lagos das Garças e das Ninféias do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). No entanto, somente o último discute de forma mais aprofundada a influência dos fatores abióticos sobre os padrões de ocorrência destes organismos. Dos 121 táxons de Chytridiomycota e 18 de Blastocladiomycota conhecidos no Brasil (Lista de espécies da Flora do Brasil 2014), aproximadamente 79% foram relatados para ecossistemas lóticos (rios, riachos e cachoeiras) e solos, principalmente em

áreas de Mata Atlântica (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), sendo a diversidade em reservatórios representada por somente 21% das espécies conhecidas no país. Este mesmo cenário pode também ser atribuído para o filo Oomycota, que possui somente 19,5% da diversidade relatada para ecossistemas lênticos (Rocha & Merighi 1986; Pires-Zottarelli, 1990; Rocha & Pires-Zottarelli, 2002; Rocha, 2004), com maior representatividade dos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Pythium* e *Saprolegnia*.

Os reservatórios possuem grande importância devido aos diversos serviços que prestam à população, principalmente no que se refere ao abastecimento público e geração de energia elétrica, sendo a hidroeletricidade a principal fonte de energia do país e responsável por 75% do total de energia produzida (Tolmasquim 2012). No entanto, sua construção gera importantes, e muitas vezes, irreversíveis impactos, como perda da biodiversidade e da qualidade da água e mudanças socioeconômicas regionais (Tundisi *et al.* 2008). Dentre os diversos impactos antrópicos gerados, a eutrofização e o uso desordenado do solo da bacia hidrográfica, são as variáveis que frequentemente têm sido associadas com a perda da qualidade da água e da biodiversidade (Pusceddu *et al.* 2007, Cunha *et al.* 2010). O processo de eutrofização tem sido bastante investigado por representar uma das principais causas de alterações na qualidade da água e redução da diversidade em águas continentais (Margalef 1983). Este processo geralmente associado ao aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, tem como consequência o aumento de suas produtividades, podendo os ecossistemas aquáticos passarem de oligotrófico ou mesotrófico para eutrófico ou mesmo hipereutrófico (Esteves 1998). Já os tipos de usos e a ocupação do solo na bacia hidrográfica possuem relações significativas no que diz respeito às diversas substâncias químicas lançadas nos corpos d'água, como efluentes domésticos, industriais e agrícolas, expondo diversos organismos a uma grande variedade de compostos mutagênicos e citotóxicos (Amaral *et al.* 2007).

Nos reservatórios essas alterações ecológicas podem ser detectadas a partir do monitoramento da água e do sedimento acumulado, seja este superficial ou depositado em camadas (Birks & Birks 2006). A análise do sedimento fornece dados cumulativos e constitui um arquivo de informações de natureza biogeoquímica, uma vez que as camadas de deposição temporais se encontram sequencialmente acumuladas (Mozeto 2004). Assim, o sedimento superficial representa uma amostra espacial e temporalmente

integrada dos eventos que se acumularam no passado recente (Smol 2008). O oxigênio, se presente, está restrito as camadas superficiais do perfil sedimentar, e por isso, os fungos presentes neste compartimento geralmente apresentam adaptações fisiológicas (mecanismo fermentativo) e/ou morfológicas (esporos de resistência) para suportar tais limitações (Wurzbacher *et al.* 2010). As leveduras e os representantes do filo Chytridiomycota são considerados os grupos de fungos mais ativos no perfil sedimentar de reservatórios (Slapeta *et al.* 2005) e técnicas de PFLA (Goedkoop *et al.* 2005, Wildenfalk *et al.* 2008) e clonagem (Dawson & Pace 2002, Luo *et al.* 2005), indicam estes dois grupos como micota dominante nos sedimentos dos lagos e reservatórios, com tendência de maior diversidade de espécies nos sedimentos localizados próximos as zonas litorâneas (Collins & Willoughby 1962, Sparrow 1968). Além disso, assim como os fungos zoospóricos, alguns poucos estudos têm apontado a importância dos oomicetos nos processos de transferência de energia no sedimento, sendo alguns gêneros, tais como *Aphanomyces* spp. e *Pythium* spp., considerados abundantes e ubíquos nas camadas superficiais do perfil sedimentar (Sparrow 1968, Boopathi *et al.* 2015, Yang & Hong, 2015, Wurzbacher *et al.* 2016). No entanto, considerando a totalidade dos estudos desenvolvidos em reservatórios, somente pouco deles (Goedkoop *et al.* 2005, Wildenfalk *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2015) analisaram a diversidade destes grupos de organismos no sedimento superficial, sendo no Brasil estes relatos inexistentes.

Estudos abordando os efeitos dos fatores físicos, químicos e biológicos no tamanho e composição das populações, natureza das interações entre parasitas e hospedeiros e importância na dinâmica da ciclagem do carbono na cadeia alimentar, ainda são escassos para estes organismos (Gleason *et al.* 2008). De acordo com Lefèvre *et al.* (2007), os representantes do filo Chytridiomycota (quítridias) são muitas vezes totalmente ignorados e erroneamente classificados em muitos estudos ecológicos, especialmente os que abordam a biodiversidade em ecossistemas aquáticos. Em lagos e reservatórios estes fungos têm sido principalmente reconhecidos como membros proeminentes da comunidade planctônica, atuando decisivamente como parasitas, afetando assim a sucessão do fitoplâncton e a produção primária. Além disso, tanto os fungos zoospóricos como os oomicetos, atuam também como decompositores de materiais recalcitrantes como quitina e celulose, e ainda disponibilizam energia dos produtores primários e detritívoros para níveis tróficos superiores, ao terem seus zoósporos predados pelo zooplâncton (Kagami *et al.* 2007, Gleason *et al.* 2008). Lefèvre *et al.* (2012) baseando-se em análises moleculares evidenciaram que estes organismos

não somente compõem a comunidade planctônica dos reservatórios estudados, mas são os organismos dominantes nestes locais. E ainda, segundo estes autores, o uso de técnicas de clonagem mostrou que, a maioria das sequências recuperadas nestes ambientes não combinou com qualquer táxon descrito, sugerindo que lagos e reservatórios abrigam uma alta e inexplorada diversidade.

Embora as atuais técnicas de clonagem indiquem os fungos zoospóricos como micota dominante de lagos e reservatórios, os fatores que afetam a variação temporal e a estrutura da comunidade ainda permanecem pouco investigados (Wurzbacher *et al.* 2016). De maneira geral, quando consideramos os fungos zoospóricos e oomicetos, a relação entre os padrões de ocorrência e distribuição em ambientes com diferentes trofias, ainda é pouco explorada em escala global (Cooke 1976, Czezug *et al.* 1989, 1990a,b, Czezug 1991a,b, Czezug & Woronowicz 1991, Lefranc *et al.* 2005, Chen *et al.* 2008, Marano *et al.* 2011, Monchy *et al.* 2011), e principalmente no Brasil (Rocha 2004). Muitos dos estudos conduzidos em ambientes com diferentes estados tróficos (Tan & Lim 1983, 1984, Czezug 1994, Rancovic 1998, Czezug & Muszynska 2001) listam principalmente a diversidade em espécies, não relacionando os padrões de sua ocorrência e distribuição com fatores abióticos. Czezug *et al.* (1990a,b) e Czezug (1991a,b) apontaram estes organismos como tolerantes e adaptados a diferentes níveis de poluição orgânica, mas relataram preferência dos mesmos por ambientes menos poluídos. Lefranc *et al.* (2005), Chen *et al.* (2008), Lepère *et al.* (2008), Monchy *et al.* (2011) e Wurzbacher *et al.* (2010, 2016) apontam, por meio de análises moleculares, que a diversidade tende a ser menor em águas mais produtivas, sendo os reservatórios oligotróficos e mesotróficos os que normalmente apresentam maior diversidade. Lefèvre *et al.* (2012) mostraram maior diversidade de quitrídias em reservatórios meso-eutróficos do que em ambientes oligotróficos, sugerindo que ambientes em estado trófico intermediário (mesotróficos) sejam os mais propícios para ocorrência destes fungos. Para o Brasil, Rocha (2004) sugeriu que a riqueza em espécies dos fungos zoospóricos e oomicetos dos lagos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), com distintas trofias (mesotrófico e eutrófico), apresentou correlação negativa com as concentrações de nitrogênio e fósforo, tendo sido demonstrada e comprovada a natureza limáfoba ou limaxena destes organismos. A autora pontua também que a ausência dos mesmos em locais amostrados com altíssimas concentrações de nitrogênio e fósforo total indica a sua possível utilização como bioindicadores de poluição, estando os mesmos completamente ausentes em tal situação.

Com relação aos padrões sazonais de distribuição desses organismos zoospóricos em ecossistemas lênticos, verifica-se uma grande escassez de estudos. Em regiões temperadas se estabelece normalmente o período chuvoso como o de maior diversidade (Czeczuga 1986; 1995; Czeczuga *et al.* 2010). Em regiões tropicais, os únicos estudos a abordarem a sazonalidade em ecossistemas lênticos brasileiros foram os de Pires-Zottarelli (1990) e Rocha (2004), os quais também apontaram ser a maior diversidade encontrada durante a estação chuvosa.

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a ocorrência, frequência e abundância dos fungos zoospóricos e oomicetos em reservatórios, com distintos estados tróficos, da Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Rio Tietê.

Objetivos específicos

- Analisar pela primeira vez a diversidade destes organismos no sedimento superficial de reservatórios do Brasil;
- Comparar a diversidade na coluna d'água e sedimento superficial;
- Evidenciar, dentre os fatores abióticos mensurados, os mais atuantes na ocorrência e distribuição dos táxons nos reservatórios amostrados;
- Sequenciar as regiões SSU, ITS, LSU, COX1, RPB1 e RPB2 dos táxons cultivados, bem como, incluí-los em análises filogenéticas;
- Disponibilizar pela primeira vez dados de ultraestrutura dos zoósporos de espécimes brasileiros de Chytridiomycota, com ênfase nas espécies de classificação filogenética incerta e com ultraestrutura desconhecida.

Hipóteses

- Se os fungos zoospóricos e oomicetos respondem a mudanças na disponibilidade de nutrientes (Gleason *et al.* 2008; Lefèvre *et al.* 2012; Wurzbacher *et al.* 2016), então, espera-se encontrar diferenças na composição de espécies entre reservatórios de diferentes trofias e, espécies associadas às diferentes disponibilidade de nutrientes;
- Considerando que a maior parte dos estudos em reservatórios analisaram a diversidade dos fungos zoospóricos e oomicetos na coluna d'água (Gleason *et al.* 2008; Wurzbacher *et al.* 2016), espera-se que a maior riqueza destes organismos seja observada neste compartimento;

- Já que maior riqueza de espécies foi observada durante a estação chuvosa, em estudos desenvolvidos em ecossistemas lênticos brasileiros (Pires-Zottarelli 1990; Rocha 2004), espera-se que a riqueza de espécies de fungos zoospóricos e oomicetos também seja maior no período chuvoso nos reservatórios estudados.

METODOLOGIA GERAL

Área de estudo

Caracterização geral da Bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê

A Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê foi definida como a “Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHI 10 – Tietê/Sorocaba” pela Lei nº 9.034/94 de 27/12/1994, e o Comitê que gerencia esta bacia (CBH-SMT), foi formado em 1995 após a implantação do Sistema Estadual de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SigRH). As principais preocupações compartilhadas para a formação do comitê foram a poluição das águas do rio Tietê e do reservatório de Itupararanga, principal manancial da bacia do Sorocaba (SigRH, 2018).

A Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê (UGRHI 10) está localizada na região centro-sudeste do Estado de São Paulo e é constituída pela Bacia do rio Sorocaba e pela bacia do Médio Tietê superior (Fig. 1). Compreende o trecho desde a barragem do Rasgão, à montante, até a barragem de Barra Bonita, à jusante. A UGRHI 10 é delimitada pelas bacias do Alto Tietê (UGRHI 06) a leste, Tietê/Jacaré (UGRHI 13) a noroeste e pela UGRHI 05 a norte e nordeste, esta última formada pelas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí, que deságuam na margem direita do rio Tietê. Na porção sul-sudoeste-noroeste, as bacias do Alto e Médio Paranapanema (UGRHIs 14 e 17, respectivamente) são as porções limítrofes da UGRHI 10 (IPT 2008). A região do Médio Tietê é muito influenciada pelas bacias a montante, tanto o Alto Tietê, que despeja grande parte do esgoto não tratados da região metropolitana de São Paulo, quanto as Bacias do Piracicaba, Capivari e Jundiaí que transportam os efluentes da Região Metropolitana de Campinas e do Município de Jundiaí e deságuam no trecho médio do Rio Tietê dentro da UGRHI10 (CBH-SMT, 2012).



Figura 1. Localização da Bacia do Sorocaba/Médio Tietê (UGRHI 10) e seus limites com as demais UGRHIs do Estado de São Paulo (Fonte: modificado de Silva & Matsumura-Tundisi 2010).

A área total da bacia do Sorocaba/Médio Tietê é de 12.099 km², abrangendo uma população de 1,650 milhões de habitantes em 54 municípios (SigRH, 2018). Está subdividida em seis sub-bacias, três delas que compõem a Bacia do Rio Sorocaba e outras três por drenagens de pequeno e médio porte, que drenam para o rio Tietê (Fig. 2). Neste trecho, o rio Tietê tem como principais afluentes os rios Jundiaí, Capivari e Piracicaba, enquanto o rio Sorocaba é formado pelos rios Una, Sorocabuçu e Sorocamirim, cujas cabeceiras se localizam nos municípios de Ibiúna, Cotia, Vargem Grande Paulista e São Roque. No início do Rio Sorocaba, suas águas foram represadas, formando o reservatório de Itupararanga, importante manancial da região, o qual é especialmente prejudicado devido à poluição que recebe da região metropolitana de São Paulo (SigRH 2018). O reservatório de Itupararanga está ligado em um contínuo ao de Santa Helena, o qual é administrado pelo grupo Votorantim e utilizado para geração de energia às fábricas de cimento. A bacia conta ainda, com unidades de conservação estaduais, municipais e com a Floresta Nacional de Ipanema (FLONA de Ipanema), importante área de conservação localizada no município de Iperó, na qual está localizado o reservatório Hedberg.

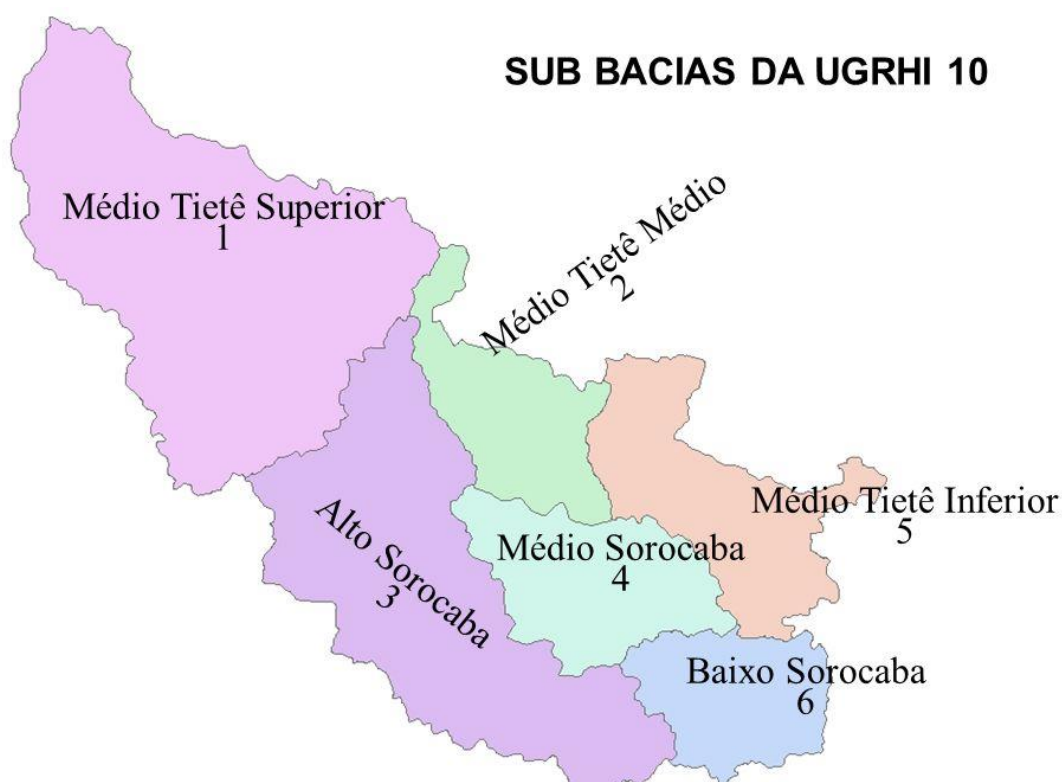


Figura 2. Localização das seis sub-bacias da UGRHI 10 (Fonte: Redes das Águas).

Caracterização dos reservatórios estudados

Três reservatórios inseridos na Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê foram inicialmente selecionados, considerando-se os seus diferentes estados tróficos. Suas características morfométricas, profundidade máxima e média, área, ano de construção e finalidade de utilização constam da tabela 1.

Tabela 1. Características morfométricas dos três reservatórios localizados na bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê (UGRHI 10).

Reservatórios	Ano construção	Estado trófico	Prof. máx. (m)	Prof. méd.(m)	Vol. máx. (m ³)	Área (km ²)	Tempo residência da água	Área de proteção	Utilização
Itupararanga	1912 ^(b)	Mesotrófico ^(d)	19 ^(d)	7.8 ^(b)	286 milhões ^(e)	936.51 ^(e)	4-13 meses ^(b)	APA de Itupararanga ^(b)	Abastecimento público ^(e)
Hedberg	1811 ^(c)	Eutrófico ^(d)	-	4.0 ^(c)	-	0.113 ^(c)	-	“FLONA de Ipanema” ^(c)	Paisagismo, pesquisa e educação ambiental ^(c)
St. Helena	1938 ^(f)	Oligotrófico ^(a)	10,5 ^(a)	-	-	-	-	Não inclusa	Geração de energia elétrica

a: Lucinda (2003); b: Secchin (2012); c: Plano de manejo - FLONA (2016); d: Projeto Acquased; e: Pedrazzi *et al.* (2014); f: Eletromemoria-USP 2015; (-): informação indisponível.

Itupararanga (Figs. 3A, 4C e 4D) – O reservatório de Itupararanga foi construído em 1912 pela empresa *São Paulo Eletric Company* conhecida como “*Light*”, e teve seu funcionamento iniciado em 1914. Inicialmente utilizado para geração de energia elétrica à população, em 1976, a Companhia Brasileira de Alumínio (CBA) ficou responsável pela sua operação e parte da energia gerada foi concentrada para abastecer a indústria de alumínio (Pedrazzi *et al.* 2014). Localizado na sub-bacia do Alto Sorocaba, região onde a economia está fortemente baseada em práticas agrícolas, este manancial tem fundamental importância no abastecimento público da região, atendendo cerca de 1.000.000 de pessoas nos municípios de Ibiúna, Sorocaba, Mairinque e Votorantim (Pereira 2008). O reservatório está incluído na Área de Proteção Ambiental (APA) de Itupararanga, criada pela Lei Estadual nº 10.100, de 01 de dezembro de 1998 e alterada pela Lei Estadual nº 11.579 de 02 de dezembro de 2003, cujo objetivo é o uso sustentável e conservação ambiental da sub-bacia do Alto Sorocaba, a qual está fortemente ameaçada pelo avanço dos loteamentos e uso intensivo de agrotóxicos (Plano Manejo, APA Itupararanga). De acordo com a classificação das águas superficiais estabelecida pela Resolução CONAMA nº 357, o reservatório se enquadra na Classe 2, podendo ser utilizado para abastecimento e consumo humano (após tratamento convencional), proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário (natação, esportes aquáticos e mergulho), irrigação e atividades de pesca.

Hedberg (Figs. 3B, 4A e 4B) – inserido na Floresta Nacional de Ipanema (FLONA), uma unidade de conservação nacional criada em 1992 e atualmente administrada pelo Instituto Nacional do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis e da Amazônia Legal (IBAMA), o reservatório Hedberg foi formado pelo barramento do rio Ipanema e mesmo estando inserido em uma Unidade de conservação, sofre com despejos de matéria orgânica proveniente de áreas urbanizadas e agrícolas existentes à montante da FLONA. Com barragem construída em 1811, durante a administração de Carl Gustav Hedberg, é considerado o primeiro reservatório com fins de geração de energia hidráulica do país e o segundo da América Latina. O reservatório foi importante na geração de energia para a produção de ferro e atualmente é um elemento fundamental na composição da paisagem, o qual teve sua margem recomposta por espécies de plantas nativas, área anteriormente destinada à fins agrícolas (Plano de Manejo, 2016). Além disso, apresenta uma ictiofauna típica de ambiente lântico composta principalmente por saguirús, carás e lambaris e por

ser um reservatório antigo, a comunidade de peixes apresenta elevado grau de estruturação (Plano de Manejo, 2016).

Em 2001, técnicos do IBAMA e CETESB, detectaram o vazamento de 40 mil litros de óleo contendo ascarel na FLONA de Ipanema. Estudos toxicológicos demonstraram que a mesma, tecnicamente denominada de alocloro 124, era altamente tóxica e cancerígena, e potencialmente contaminante do solo e água (subterrânea ou superficial). Na época do vazamento, os técnicos estimaram que a contaminação afetou uma área de 5.000 m² internos ao FLONA, e que poderia ter atingido o lençol freático, o rio Ipanema, além do reservatório Hedberg.

Santa Helena (Figs. 3C, 4E e 4F) - localizado no entorno do município de Votorantim e na divisa dos municípios de Mairinque e Alumínio, o reservatório é formado pelo represamento do rio Sorocaba e está interligado ao reservatório de Itupararanga (Eletromemoria-USP, 2015). As encostas do reservatório são ocupadas por atividades pecuárias restritas, por remanescentes de mata nativa, reflorestamentos e áreas de lazer, podendo ser observada a montante as instalações da fábrica de cimentos Santa Helena (unidade industrial do Grupo Votorantim) (Eletromemória-USP, 2015).

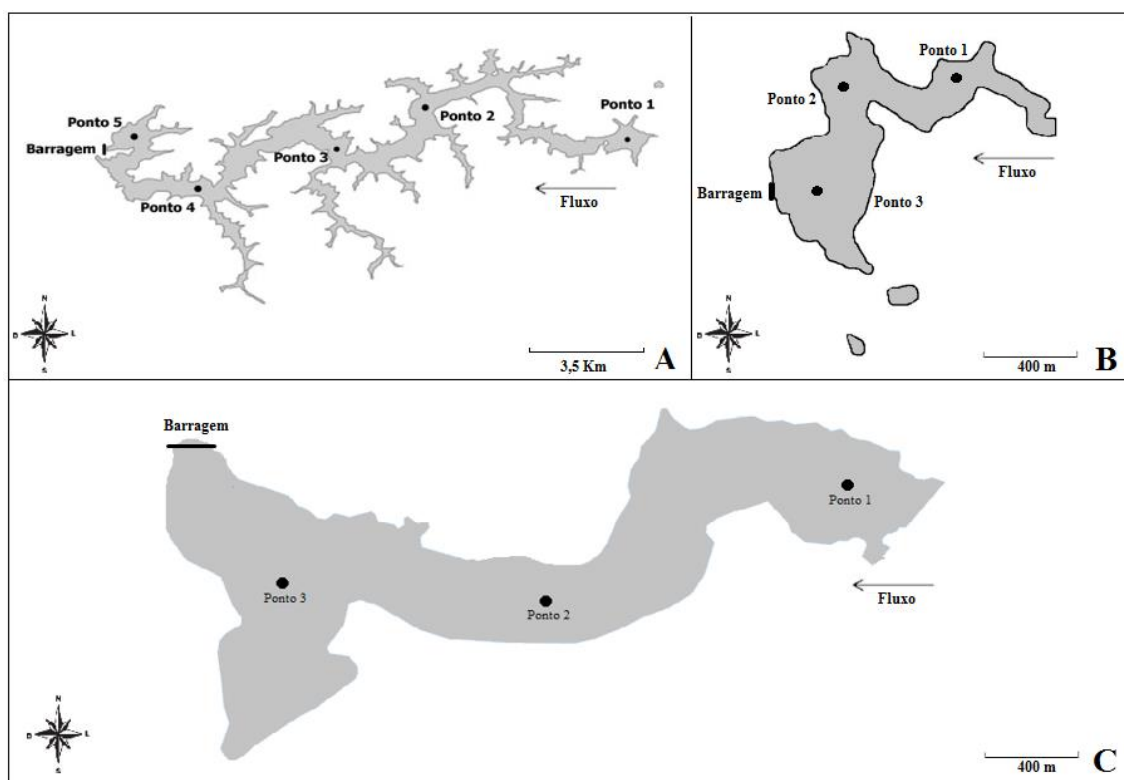


Figura 3 A-C. Localização dos pontos de coleta nos reservatórios de Itupararanga (A), Hedberg (B) e Santa Helena (C). Fonte: Projeto AcquaSed- FAPESP-2009/53898-9

Periodicidade de amostragem e seleção dos pontos de coleta

Durante os anos de 2014 e 2015 foram realizadas quatro amostragens (Agosto/2014; Dezembro/2014; Março/2015 e Julho/2015), nas quais foram coletadas amostras de água em diferentes profundidades da coluna d'água, bem como no sedimento superficial. Os pontos de coleta (Tab. 2 e Fig. 3) foram definidos em estudo prévio (projeto temático AcquaSed – n° processo FAPESP-2009/53898-9), considerando o corpo central dos principais braços, a entrada dos principais tributários, além da proximidade com as estações de captação de água (Figs. 3 e 4).

Tabela 2. Pontos de coleta dos três reservatórios da Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê (Fonte: Projeto AcquaSed- FAPESP-2009/53898-9)

Reservatório	Ponto	Coordenadas	
		Sul	Oeste
Santa Helena	1	23°34'49,92"	47°25'32,64"
	2	23°34'58,56"	47°25'50,52"
	3	23°34'54,30"	47°26'12,12"
Hedberg	1	23°25'55,86"	47°35'33,06"
	2	23°25'40,86"	47°35'31,14"
	3	23°25'33,72"	47°35'42,66"
Itupararanga	1	23°37'11,58"	47°13'59,34"
	2	23°36'51,96"	47°18'50,22"
	3	23°37'12,96"	47°19'37,20"
	4	23°38'50,36"	47°22'14,52"
	5	23°36'53,10"	47°23'34,70"

Em cada coleta foram amostrados 11 pontos, considerando-se os três reservatórios (Fig. 3, 4 e Tab. 2), sendo em cada um deles coletadas amostras em diferentes profundidades da coluna d'água (superfície, profundidade média e 1m acima do fundo), bem como do sedimento superficial (2 cm superficiais).



Figura 4 A-F. Reservatórios amostrados durante o período de estudo. A-B. Hedberg. C-D. Itupararanga. E-F. Santa Helena.

Amostragem do sedimento superficial e coluna d'água

As amostras de sedimento superficial de cada ponto foram coletadas com auxílio do testemunhador de gravidade UWITEC™ (Fig. 5A-C), aproveitando-se os dois primeiros centímetros superficiais, os quais geralmente integram de um a dois anos de informação (Smol 2008), enquanto as diferentes profundidades da coluna d'água foram coletadas em garrafa de Van Dorn (Fig. 5D e 5E).



Figura 5 A-E. Equipamentos utilizados para coleta de água e sedimento. A-C. Testemunhador de gravidade UWITEC. D-E. Garrafa de Van Dorn

Fatores abióticos mensurados na coluna d' água e sedimento superficial

Água: Em cada ponto de amostragem foram medidos *in situ* os perfis verticais de temperatura, pH e condutividade elétrica a cada 0,5m até a estabilização do perfil térmico e, a partir desse ponto, a cada 1,0m até o fundo, utilizando sonda U51-Horiba. A transparência da água foi determinada a partir da profundidade de desaparecimento do disco de Secchi e o cálculo da profundidade da zona eufótica feito multiplicando-se por 2,7 o valor da profundidade obtido pelo disco de Secchi (Cole 1994). O oxigênio dissolvido foi analisado adotando-se o método de Winkler modificado (Golterman & Clymo 1969), e o nitrogênio total e o fósforo total seguiram a metodologia de Valderrama (1981).

Sedimento: Os marcadores geoquímicos avaliados no sedimento superficial foram o fósforo total, o carbono orgânico total e o nitrogênio total (Valderrama 1981, Andersen 1976). Com o objetivo de compor a heterogeneidade das estações de amostragem, as amostras de sedimento ($n = 3$) foram integradas antes da realização de cada análise, utilizando-se sempre a mesma alíquota de cada amostra individual. Os dados foram obtidos junto ao projeto Acquased (nº processo FAPESP-2009/53898-9), com o qual este estudo está vinculado.

Cálculo do Índice de Estado Trófico (IET) e Clorofila-a

O Índice de Estado trófico (IET) dos reservatórios foi analisado mediante a quantificação do fósforo total e clorofila-a. Esta última, pigmento clorofilado dominante nas algas, além de ser utilizada para caracterizar o estado de trofia de um corpo de água, pode ser usada para estimar a composição da biomassa algal (população fitoplanctônica). Porém, deve-se observar que a concentração de pigmentos das algas pode variar amplamente, dependendo do metabolismo, luz, temperatura, disponibilidade de nutrientes, além de muitos outros fatores. Além disto, pigmentos clorofilados podem se degradar para produtos relativamente estáveis, como as feofitinas, que interferem nos métodos de determinação da clorofila-a (Wetzel 2001). Para quantificação deste pigmento, as amostras foram filtradas a vácuo em filtros Whatman GF/F 47 mm, sob baixa pressão ($<0,5$ atm), ainda no dia de coleta. Em seguida, foi empregado o método do etanol 90% aquecido por 5 minutos, sem maceração (Sartory & Grobeller 1984). Os cálculos foram baseados em Golterman *et al.* (1978) com correção da feofitina. Optou-se por calcular o IET sem os dados do disco de Secchi, uma vez que os valores de transparência muitas vezes não são representativos do estado de trofia, pois esta pode ser afetada pela elevada turbidez decorrente de material mineral em suspensão e não apenas pela densidade de organismos planctônicos (CETESB 2013). Para a classificação do grau de trofia foi adotado o critério proposto por Carlson (1977) modificado por Lamparelli (2004) (Tabela 3).

Tabela 3. Critério utilizado para classificação da trofia dos reservatórios segundo Carlson (1977), modificado por Lamparelli (2004).

CLASSIFICAÇÃO IET	
Ultraoligotrófico	$IET \leq 47$
Oligotrófico	$47 < IET \leq 52$
Mesotrófico	$52 < IET \leq 59$
Eutrófico	$59 < IET \leq 63$
Supereutrófico	$63 < IET \leq 67$
Hipereutrófico	$IET > 67$

Plaqueamento e iscagem das amostras

Em laboratório, as amostras coletadas foram iscadas com substratos celulósicos (epiderme de cebola, palha de milho, celofane e semente de *Sorghum* sp.), quitinoso (exoesqueleto de camarão), queratinoso (ecdise de cobra), bem como grãos de pólen de *Pinus* sp., seguindo metodologia descrita em Milanez *et al.* 1989. Todos os substratos (iscas), quando possível, foram padronizados em discos de 0,6 cm de diâmetro, dos quais foram adicionados dois pedaços por placa, no intuito de padronizar a metodologia e cálculos comparativos. Para as amostras de diferentes profundidades da coluna d'água foram utilizados 30 mL para cada amostra, enquanto para o sedimento superficial, compartimento ainda pouco analisado com relação à diversidade de organismos zoospóricos, foram padronizados 15 g para cada amostra, os quais foram diluídos em 30 mL de água destilada autoclavada. Esta quantidade foi adotada com base nos procedimentos de iscagem de solo para os organismos zoospóricos (Jesus *et al.* 2013, Jerônimo *et al.* 2015).

Análises estatísticas e índices de diversidade

A abundância (A) foi determinada com base no número de ocorrências, considerando a presença ou ausência dos táxons em cada tipo de isca, nas diferentes profundidades da coluna d'água (superfície, meio e fundo) e sedimento superficial (Nascimento *et al.* 2011, adaptado). A frequência de ocorrência foi calculada em cada estação (seca ou chuvosa) considerando-se: (número de amostras colonizadas por um determinado táxon/número de amostras analisadas) \times 100.

A estrutura da comunidade nas diferentes estações (seca e chuvosa) foi caracterizada pela: (i) riqueza de espécies (S); (ii) Índice de diversidade de Shannon: $(H') = -\sum p_i \ln p_i$, onde p_i é a abundância da espécie i na comunidade; (iii) Equitatividade (E) =

H'/H_{max}' , em que H_{max}' é o valor máximo de diversidade para o número de táxons presentes; (iv) Índice de dominância de Simpson: $(D) = 1 - \sum (p_i)^2$ baseado na abundância dos táxons (Zak & Willig 2004); e (v) Índice de similaridade de Sorensen, utilizado para comparar a composição dos táxons entre as estações (seca e chuvosa) e compartimentos (coluna d'água e sedimento superficial), sendo $SI = [2c/(a + b)] \times 100$, onde “c” é o número de táxons comuns em ambas as estações ou compartimentos, “a” é o número de táxons exclusivos da estação seca ou coluna d'água e “b” é o número de táxons exclusivos da estação chuvosa ou sedimento superficial (Müeller-Dombois & Ellefberd 1974).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para ordenar os dados abióticos a partir de uma matriz de correlação, onde os dados foram transformados para $\log(x + 1)$, exceto pelo pH. As PCoAs dos dados bióticos da coluna d'água e sedimento superficial foram calculadas com base na distância euclidiana com base na riqueza dos táxons, para os quais foram desconsiderados os táxons com apenas uma ocorrência ao longo do estudo. Ambas as análises, assim como a transformação, foram realizadas no programa PC-ORD 6.0 (McCune & Mefford, 2011).

Variáveis climáticas

Os dados das variáveis climáticas foram obtidos nas estações meteorológicas mais próximas dos locais de amostragem, sendo os dados de Itupararanga e Santa Helena cedidos pelo Grupo Votorantim, enquanto os de Hedberg foram disponibilizados pela sede da Marinha no município de Ipêro. As variáveis incluíram os valores médios de precipitação pluviométrica e temperatura do ar, os quais foram representados de forma gráfica.

Isolamento, cultivo e manutenção dos organismos zoospóricos

Os espécimes de organismos zoospóricos, isolados em iscas, foram inoculados em meio de cultura a partir de fragmentos de micélio e rizomicélio ou por meio da captura de zoósporos no momento da liberação dos mesmos (Sparrow 1960). Os espécimes foram posteriormente purificados em meio de cultura sólido contendo 100 mg/L de penicilina G e 100 mg/L de sulfato de estreptomicina (**PmTG** – 0,4 g leite peptonizado, 0,4 triptona, 2,5 g glicose, 16 g ágar, 1 L água destilada; **CMA com glicose** – 16 g *corn meal* ágar, 2,5 g glicose, 1 L água destilada; **YpSs** – 4 g extrato de levedura, 15 g amido solúvel, 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1 L água destilada e/ou **MP₅** – 4 g maltose, 1 g peptona,

16 g ágar, 1 L água destilada) e então depositados na Coleção de Cultura de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt) (Fig. 6A-M). Os representantes de Oomycota foram preservados em tubos com meio de cultura sólido (MP₅, CMA), e em frascos Wheaton contendo água destilada autoclavada, nos quais foram adicionados fragmentos de meio de cultura contendo micélio em desenvolvimento, além de sementes de *Sorghum* sp. Já os isolados de Chytridiomycota foram preservados em tubos contendo meio de cultura sólido (CMA com glicose e PmTG), além de serem criopreservados (método descrito abaixo). Os isolados de ambos os grupos foram mantidos em sala climatizada (17°C), além de serem estocados em geladeira a cerca de 4°C.

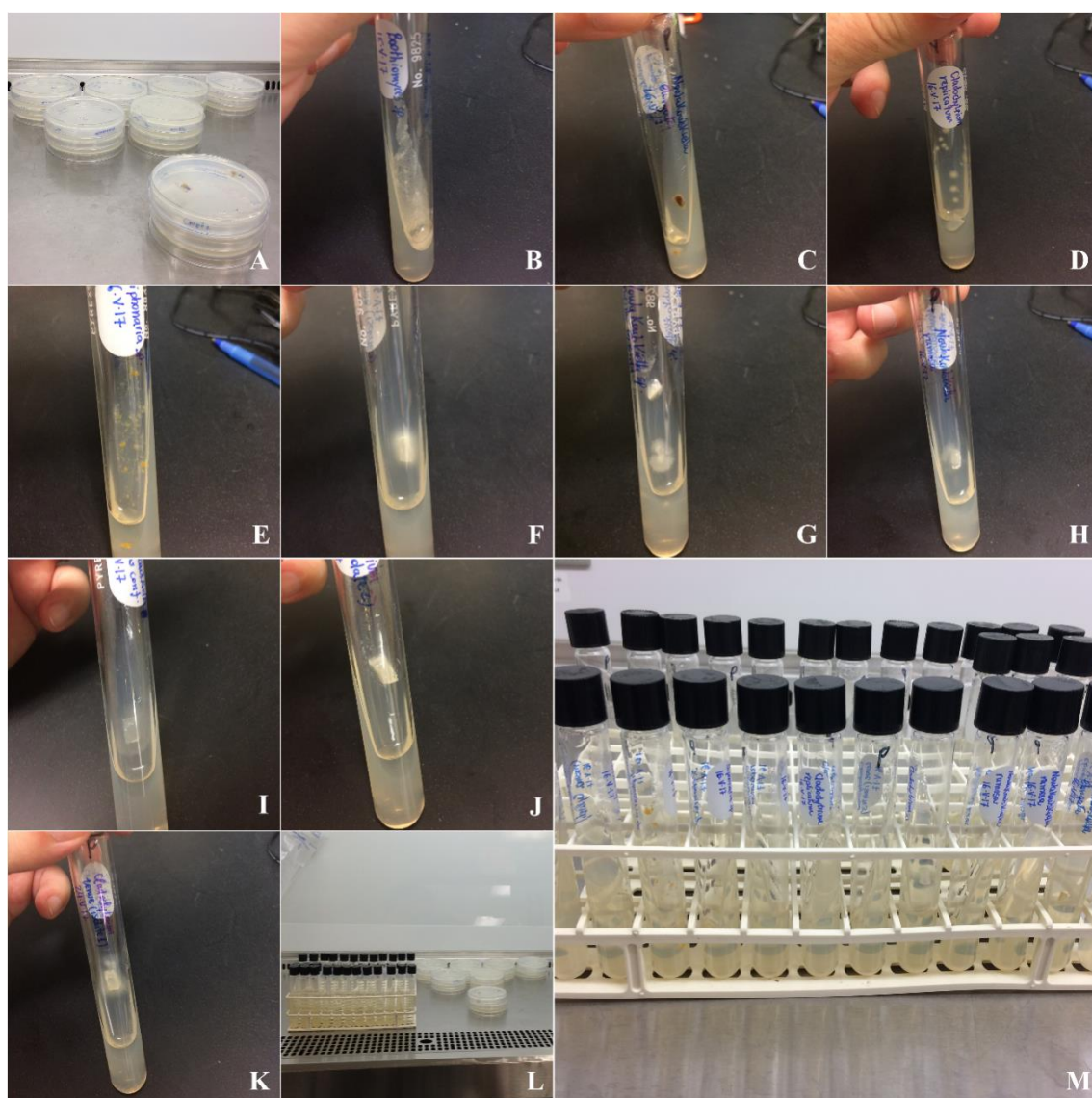


Figura 6 A-M. Inclusão dos isolados de Chytridiomycota na Coleção de Cultura de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica CCIBt. A. Culturas purificadas em placas. B-K. Crescimento dos isolados em tubos contendo meio de cultura PmTG. L-M. Armazenamento na coleção

Criopreservação dos isolados de Chytridiomycota

A fim de preservar os isolados e mantê-los viáveis por um longo período, optamos por criopreservá-los de acordo com o protocolo descrito em Boyle *et al.* (2004) e resumido a seguir: cada isolado de Chytridiomycota foi cultivado em meio líquido PmTG (35 mL) em tubos de centrífuga (tubos Falcon®) por duas (espécies monocêntricas) ou três semanas (quitridias policêntricas) (Fig. 7A). Após este período, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante removido para obtenção da biomassa fúngica. Durante este processo, foi preparado o meio criopreservante (10 mL de meio líquido PmTG, 1 mL de dimetilsulfato (DMSO) e 1 mL de soro fetal bovino) do qual, foram adicionados 6 mL em cada tubo Falcon contendo o “pellet”. Esta mistura foi pipetada para dissolver o “pellet” e depois 1 mL foi adicionado em cada criotubo (6 criotubos por isolado). Após o período de incubação apropriado (30 min em temperatura ambiente), todos os criotubos foram colocados em um recipiente criopreservante e depois estocados em ultra-freezer (Fig. 7B-F).

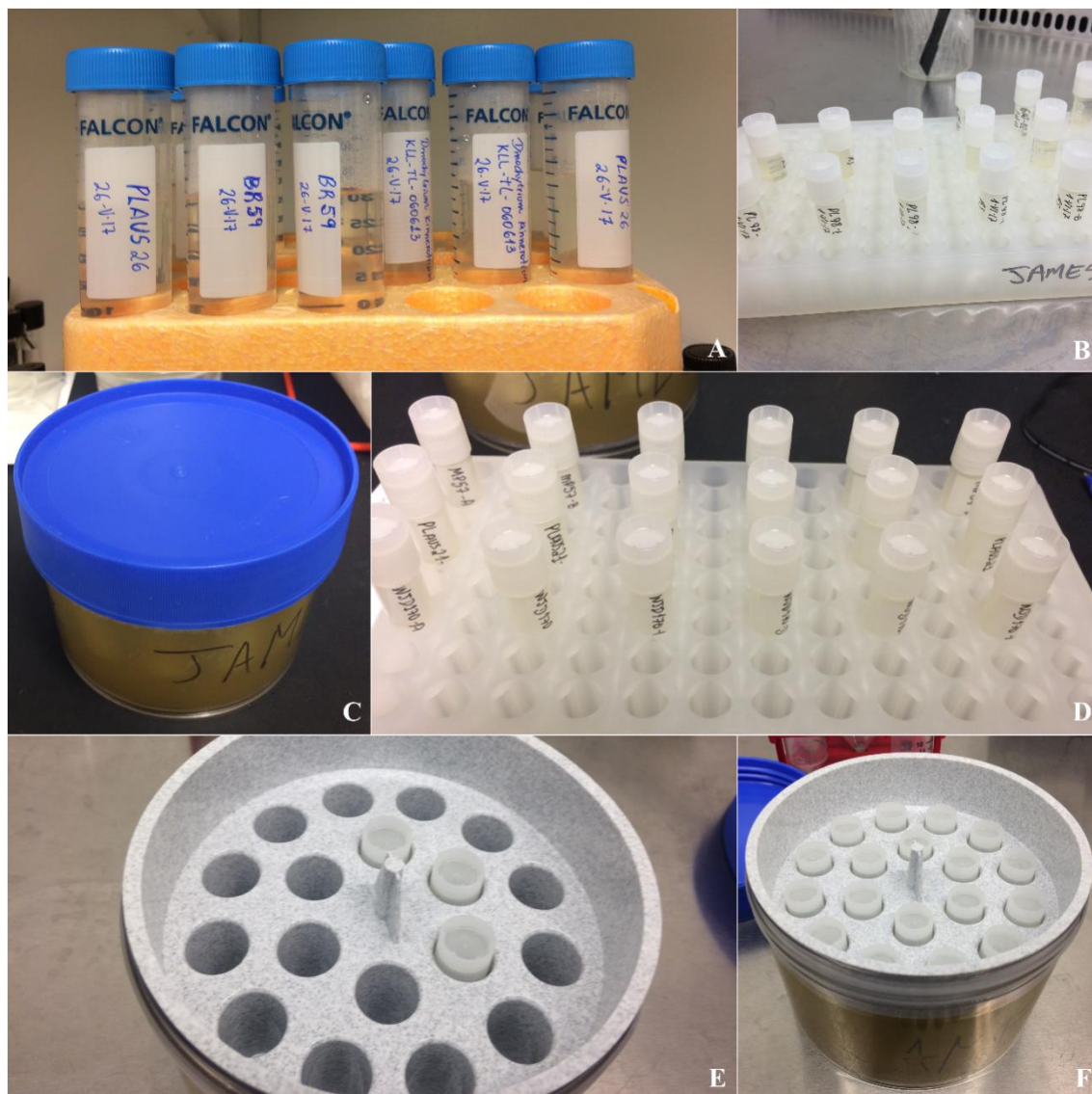


Figura 7 A-F. Protocolo de criopreservação. A. Adição da solução criopreservante nos tubos Falcon®. B. Transferência da solução contendo o “pellet” de tecido para os criotubos. C-F. Estoque dos criotubos no container criopreservante

Extração, amplificação, sequenciamento e análises filogenéticas dos organismos zoospóricos

O DNA genômico dos espécimes cultivados foi extraído a partir de culturas puras, com auxílio do kit de extração “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen™). Para os fungos zoospóricos, as regiões SSU (18S), ITS e LSU (28S) do rDNA foram amplificadas, respectivamente, com os “primers” NS4/SR1R, ITS4/ITS5 (White *et al.* 1990) e LR0R/LR5 (Vilgalys 2013), enquanto as regiões RPB1 e RPB2 (mDNA) foram amplificadas com os “primers” RPB1Af/RPB1Dr (Stiller & Hall 1997) e RPB26.5f/RPB211br (Liu *et al.* 1999), respectivamente. De acordo com Liu *et al.* (2006), as regiões SSU (18S), RPB1 e RPB2, são altamente conservadas e fornecem informações

filogenéticas com alto grau de confiança para altos níveis hierárquicos (ordens, classes e filos), enquanto as regiões ITS e 28S podem ser utilizadas para análises filogenéticas mais precisas (espécies, gêneros e famílias) (James *et al.* 2006). Já para os representantes de Oomycota, as regiões ITS, LSU e COX1 foram amplificadas com os “primers” UN-up18S42/UN-lo28S22 (Levesque & de Cock 2004), LR0R/LR6-O (Riethmüller *et al.* 2002) e OomCoxI-Levup/OomCoxI-Levlo (Robideau *et al.* 2011), respectivamente. Robideau *et al.* (2011), apontam que a região COX1 do mDNA juntamente com a ITS do rDNA podem ser utilizadas para identificação dos táxons em nível específico e que, em alguns casos, o COX1 pode ser mais efetivo do que a região ITS. As reações de PCR foram realizadas com o kit “PCR Supermix” (Invitrogen©) e os parâmetros inseridos no termociclador foram os descritos em James *et al.* (2006): 94°C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 5 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, os amplicons foram purificados com o kit AxyPrep PCR Clean-up (Axygen©). As sequências consenso foram geradas no programa “Sequencher™ 4.1.4” (Gene Codes), enquanto o alinhamento foi realizado online pela ferramenta MAFFT 7.058 (Kazutaka & Daron 2013). As diferentes regiões gênicas foram concatenadas no SequenceMatrix 1.8 (Vaidya *et al.* 2010), enquanto a escolha dos modelos de substituição de nucleotídeos foi realizada no programa JModelTest 2.2.4. Os filogramas de Máxima Verossimilhança foram construídos no Garli 2.01 (Bazinet & Cummings 2008) (para análises concatenadas) e no PhyML 3.1 (Guindon and Gascuel 2003) para análises de uma única região gênica.

Ultraestrutura dos zoósporos de representantes de Chytridiomycota

A ultraestrutura dos zoósporos é um tipo de análise onde se observa a presença ou ausência de determinadas organelas, bem como sua posição relativa dentro da célula, através de microscopia eletrônica de transmissão. Esta ferramenta é usualmente utilizada no estudo dos fungos zoospóricos (Chytridiomycota, Blastocladiomycota e Neocallimastigomycota), pois alguns autores como Li *et al.* (1993) e Letcher *et al.* (2005) admitem que as características ultraestruturais são evolutivamente mais conservadas do que a morfologia do talo e, portanto, fornecem informações importantes sobre a inter-relação dos táxons.

O passo mais crítico para análise da ultraestrutura dos zoósporos é justamente a produção de quantidade suficiente de zoósporos em meio de cultura sólido. Ao longo do processo ocorrem inúmeras perdas, e caso a quantidade inicial não seja adequada, dificilmente será possível observar todas as estruturas no final do processo. Com o intuito de estimular a produção máxima de zoosporângios e zoósporos, foi preparado o meio de cultura YpSs/8 utilizando água de solo, assim como mencionado por Lucarotti (1981). De acordo com este autor, este meio foi capaz de estimular ou aumentar a produção de zoosporângios e zoósporos nas espécies *Cladochytrium replicatum* Karling e *Nowakowskiella elegans* Nowak. O meio foi preparado aquecendo-se 7 g de solo de jardim (~65°C) com 0,05 g de carbonato de cálcio em 250 mL de água destilada durante 2 horas em 2 dias consecutivos. Esta mistura foi então filtrada duas vezes com filtro de papel Whatman® n°.1, diluída (uma parte de água de solo para duas partes de água destilada) e por fim autoclavada (Fig. 8A-F).



Figura 8 A-F. Preparo do meio YPSS/8 utilizando água de solo. A-C. Aquecimento do solo. D-E. Filtragem do solo. F. Plaqueamento do meio YPSS/8

As análises de ultraestrutura dos isolados de Chytridiomycota foram realizadas em parceria com o laboratório do Dr. Timothy Y. James (Evolutionary Genetics of Fungi Laboratory) em Michigan (EUA), durante o período de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), financiada pela Fapesp (nº processo FAPESP 2016/25800-8). O protocolo utilizado está descrito e ilustrado com detalhes abaixo, por ser o primeiro desta natureza descrito totalmente em português.

Protocolo de Microscopia Eletrônica de Transmissão (Chytridiomycota)

Crescimento dos isolados e coleta de zoósporos (Fig. 9A-C): Vinte placas de Petri contendo meio de cultura sólido (PmTG) foram inoculadas com culturas puras, e então incubadas a aproximadamente 25°C. Entre 7 e 15 dias, ou assim que os zoosporângios tiverem crescido por toda a extensão da placa, as mesmas foram submersas com água deionizada ultrapura (1 mL por placa) (Fig. 9A) e então, o líquido contendo os zoósporos foi coletado após 1 hora de submersão, o qual foi adicionado a um tubo Falcon® (Fig. 9B, C).

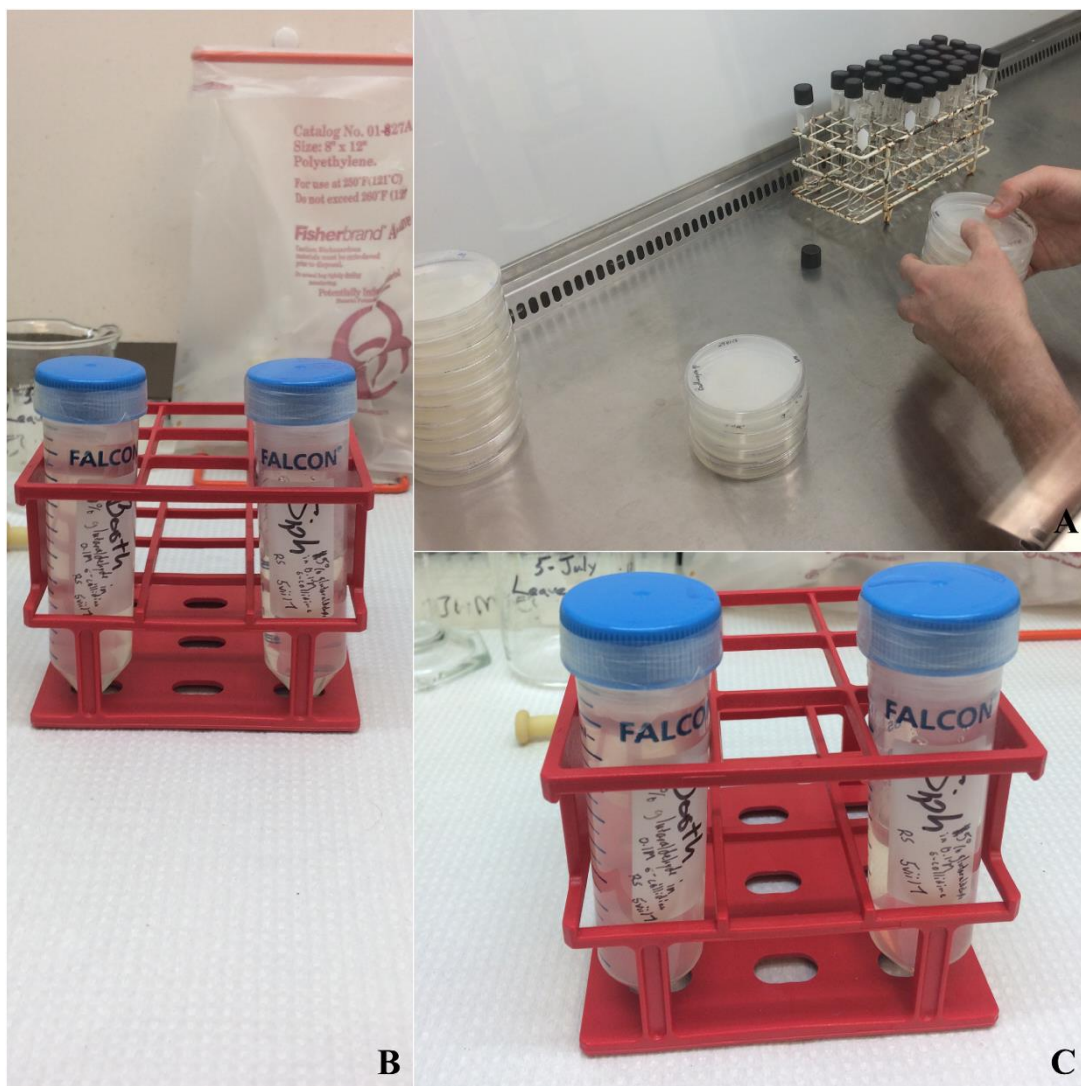


Figura 9 A-C. Crescimento e coleta de zoósporos de quitridias A. Submergindo as placas. B-C. Fixando os zoósporos com glutaraldeído 3%

Preparo dos reagentes: para as etapas de fixação é necessária a preparação prévia dos reagentes descritos abaixo (Fig. 10A-G)

1. Tampão 0,2 M sym-colidina: foi utilizado o kit s-colidina comercializado pela EMS[®] (Electron Microscopy Sciences). O kit contém ampolas de 9 mL de ácido clorídrico (HCL a 2N) e de 5,34 mL de s-colidina. A solução foi preparada pela adição de uma ampola de 9 mL de HCL (2N) e 1 ampola de 5,34 mL de s-colidina em uma Becker de 500 mL de capacidade. Foram então adicionados 186 mL de água deionizada ultrapura, resultando em uma solução tampão final de 200 mL.

2. Tampão 0,1 M sym-colidina: 50 mL da solução tampão a 0,2 M de s-colidina (passo anterior, 1) foi diluída em 50 mL de água deionizada ultrapura, resultando em uma solução tampão final de 100 mL de s-colidina a 0,1M.
3. Tampão 0,05 M sym-colidina: 25 mL da solução tampão de 0,1 M (passo 2) de s-colidina foi diluída em 75 mL de água deionizada ultrapura, resultando em uma solução tampão final de 100 mL de s-colidina a 0,05M.
4. Tampão de gluteraldeído 3% em 0,1 M de s-colidina: uma ampola de 10 mL de gluteraldeído a 50% foi diluída em 156 mL de tampão s-colidina a 0,1 M, resultando em 166 mL de gluteraldeído a 3%.
5. Acetona 100% com esferas de cerâmica (3A): a acetona 100% foi preparada com adição de esferas de cerâmica (tamanho 3A) para remoção da água residual. Este reagente deve ser preparado na semana que antecede o início do protocolo de fixação.
6. Solução de tetróxido de ósmio 1%: foi utilizado o tetróxido de ósmio da EMS[®]. Uma ampola de 2 mL (4% de concentração inicial) foi diluída em 2 mL de água deionizada ultrapura, resultando em uma solução de 4 mL (2% de concentração). Essa solução foi diluída novamente em mais 1 mL de água deionizada ultrapura, resultando então na solução de trabalho de 1% de tetróxido de ósmio.
7. Acetato de uranila a 2%: foi utilizado o acetato de uranila (EMS[®], 25 g UrAc), o qual foi diluído em 10 mL de etanol 70% até a saturação. Essa solução adicionada em um frasco âmbar, para evitar contanto com a luz, e então mantida em temperatura ambiente.

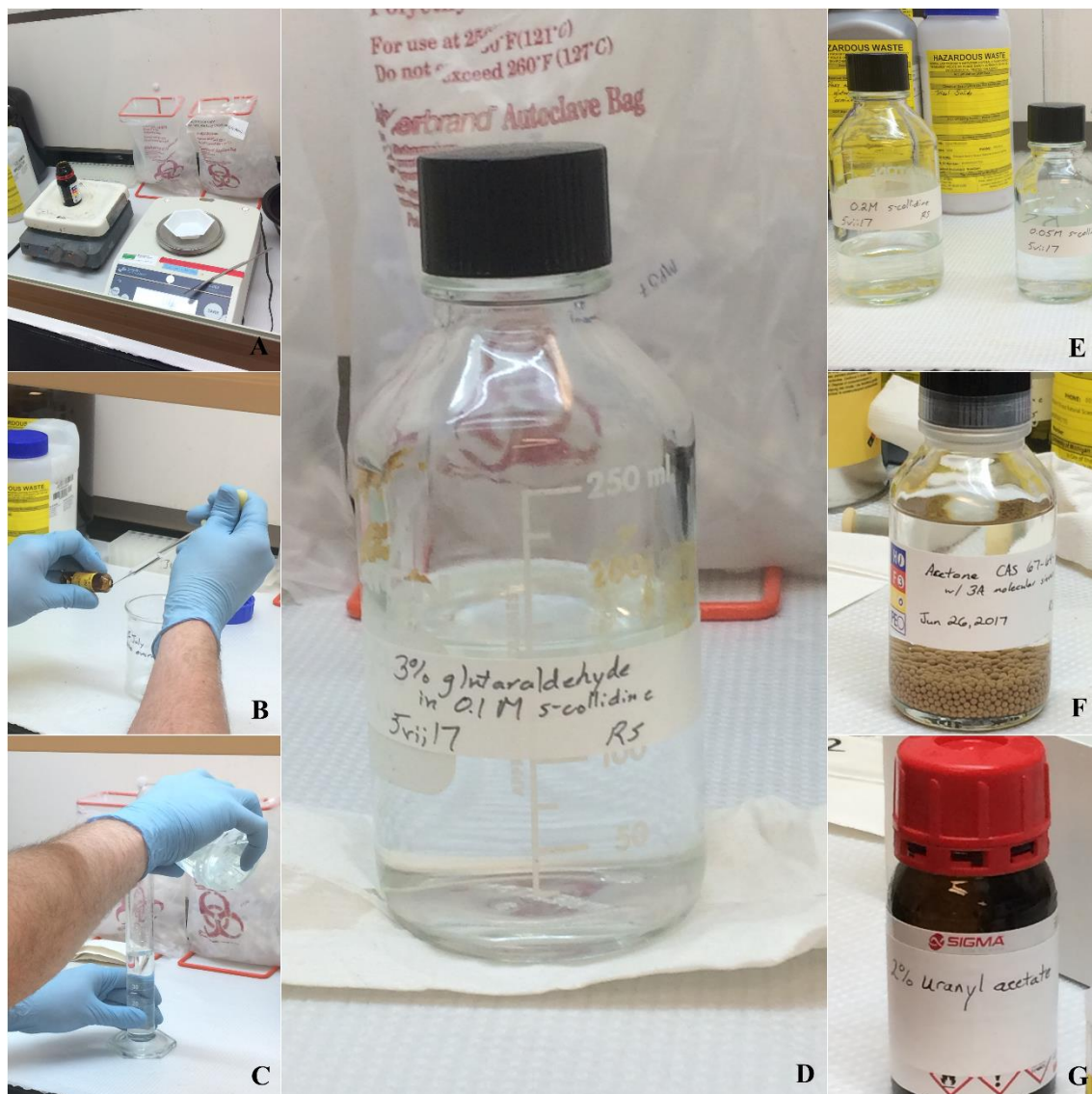


Figura 10 A-G. Preparo dos reagentes. A-D. Preparo do glutaraldeído a 3%. E. Diluições de s-colidina. F. Acetona a 100%. G. Acetato de uranila a 2%

Fixação dos zoósporos: igual volume de glutaraldeído 3% (20 mL) foi adicionado aos tubos Falcon contendo a suspensão de zoósporos removidos das placas. Essa solução penetra e fixa os zoósporos em cerca de hora de contato, mas para otimização dos efeitos, os frascos foram mantidos na geladeira ($\sim 5^{\circ}\text{C}$) durante a noite (Fig. 9B, C).

Lavagem: o material fixado foi subsequentemente lavado por três vezes com solução tampão de 0,1 M de s-colidina para remoção do glutaraldeído residual. Após cada procedimento de lavagem, os zoósporos foram centrifugados a $\sim 3\text{G}$ para formação de “pellet” e o sobrenadante descartado, com posterior resuspensão do “pellet” em tampão de s-colidina a 0,1 M.

Osmificação (Fig. 11A-D): O material anteriormente fixado e lavado foi então pós-fixado em 1% de tetróxido de ósmio e mantido na geladeira durante a noite. Assim que a solução de tetróxido de ósmio entra em contato com o “pellet” de zoósporos, o mesmo adquire uma coloração escurecida (Fig. 11D). Após o período de osmificação, o material foi lavado uma vez com s-colidina a 0,1 M, seguido por três lavagens com água deionizada ultrapura, para remoção de qualquer resíduo de tetróxido de ósmio.

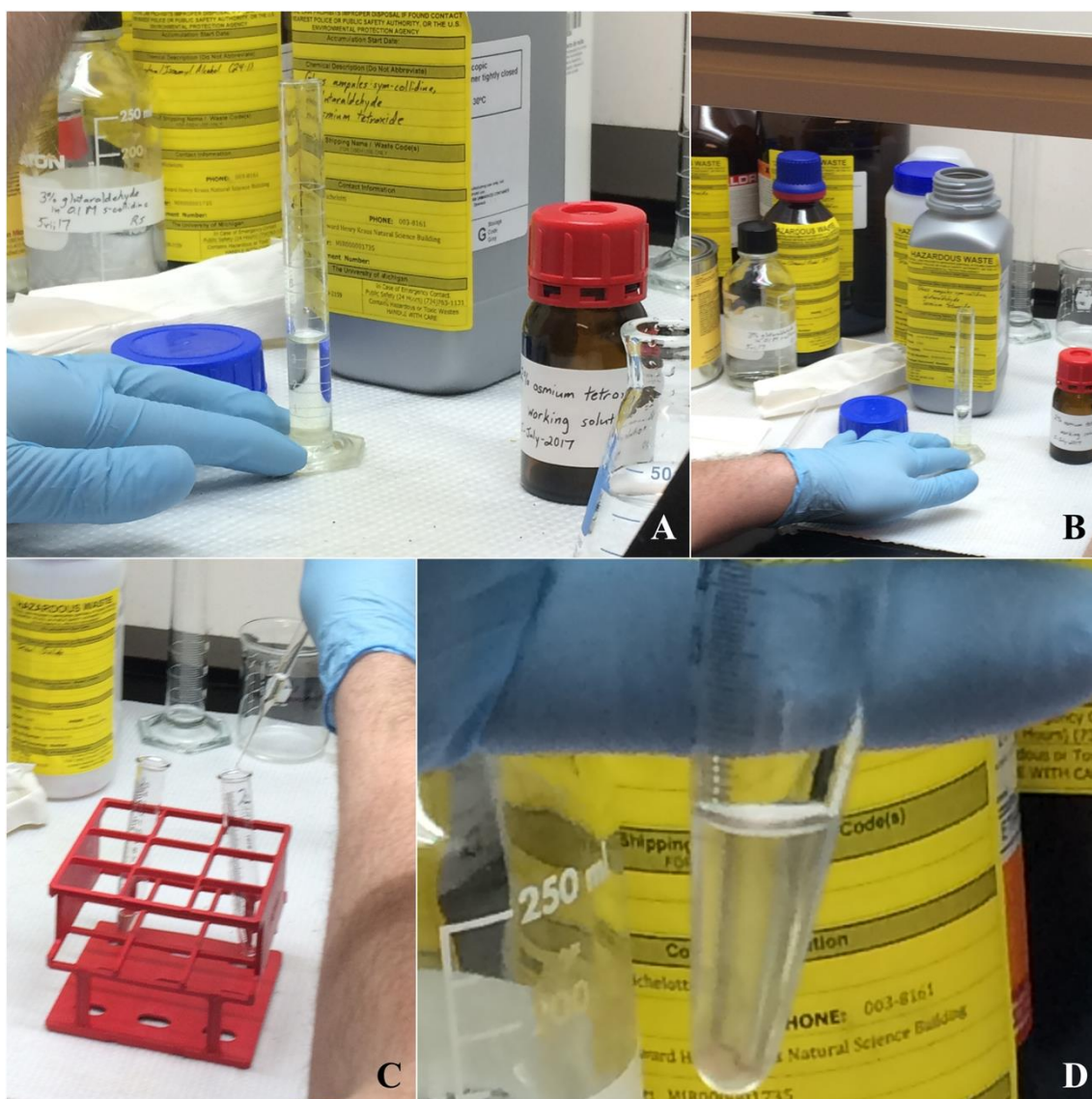


Figura 11 A-D. Osmificação. A-C. Pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio. D. Reação do tetróxido de ósmio com o “pellet” de zoósporos

Infusão em ágar (Fig. 12 A-P): Após as lavagens da etapa de pós-fixação, o “pellet” foi infundido com 2% de ágar nobre. Para preparação do ágar nobre, 25 mL de água deionizada ultrapura foi misturado com 0,5 g de ágar nobre e aquecido até o ágar se

dissolver por completo (Fig. 12A-E). Ainda quente, o ágar nobre foi adicionado em um tubo de vidro de fundo cônico contendo o “pellet” de zoósporos, o qual foi deslocado para o meio da coluna de ágar (esse talvez seja o passo mais delicado do processo, pois o “pellet” pode se desfazer facilmente, diluindo tanto a suspensão de zoósporos, que os encontrar no final seja muito complicado). Uma vez que “pellet” tenha sido infundido em ágar aquecido, ele foi colocado na geladeira por 15 minutos para solidificar. Após a solidificação do ágar, o bloco de ágar contendo o “pellet” no centro, foi removido do tubo de vidro e colocado em uma placa de Petri (Fig. 12G-I). O material infundido foi dissecado em pequenos blocos de ágar (Fig. 12J-N), os quais foram colocados em um recipiente de plástico contendo 16 mL de água deionizada ultrapura (Fig. 12O-P).



Figura 12 A-P. Infusão do “pellet” com 2% de ágar nobre. A-E. Preparação do ágar nobre. F. Adição de ágar nobre líquido. G-I. Remoção do ágar solidificado do tubo de vidro. J-N. Dissecção do bloco de ágar em blocos menores. O-P. Adição de água deionizada ultrapura

Desidratação: para remoção de toda a água do passo anterior, um agente desidratante (acetona) foi adicionado em uma serie gradual de 10%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95% de concentração durante 20 minutos em cada diluição, além de duas adições de acetona 100%, por 20 minutos, após as etapas anteriores.

Preparo da resina Epon-Araldite (Fig. 13A-P): essa resina foi preparada usando cinco reagentes, os quais foram adicionados sequencialmente e misturados por 5 minutos, entre cada nova adição (Fig. 13A-P). Inicialmente foram adicionados 11 mL de anidrido dodecenil-succínico (DDSA) (Fig. 13B-F), seguido por 5,2 mL de resina Epon (812) (Fig. 13G-I), 8,1 mL de araldite (Fig. 13J-L), 0,75 mL de dibutilftalato (Fig. 13M) e 27 gotas de Tris-dimetilaminometil fenol (DMP 30).

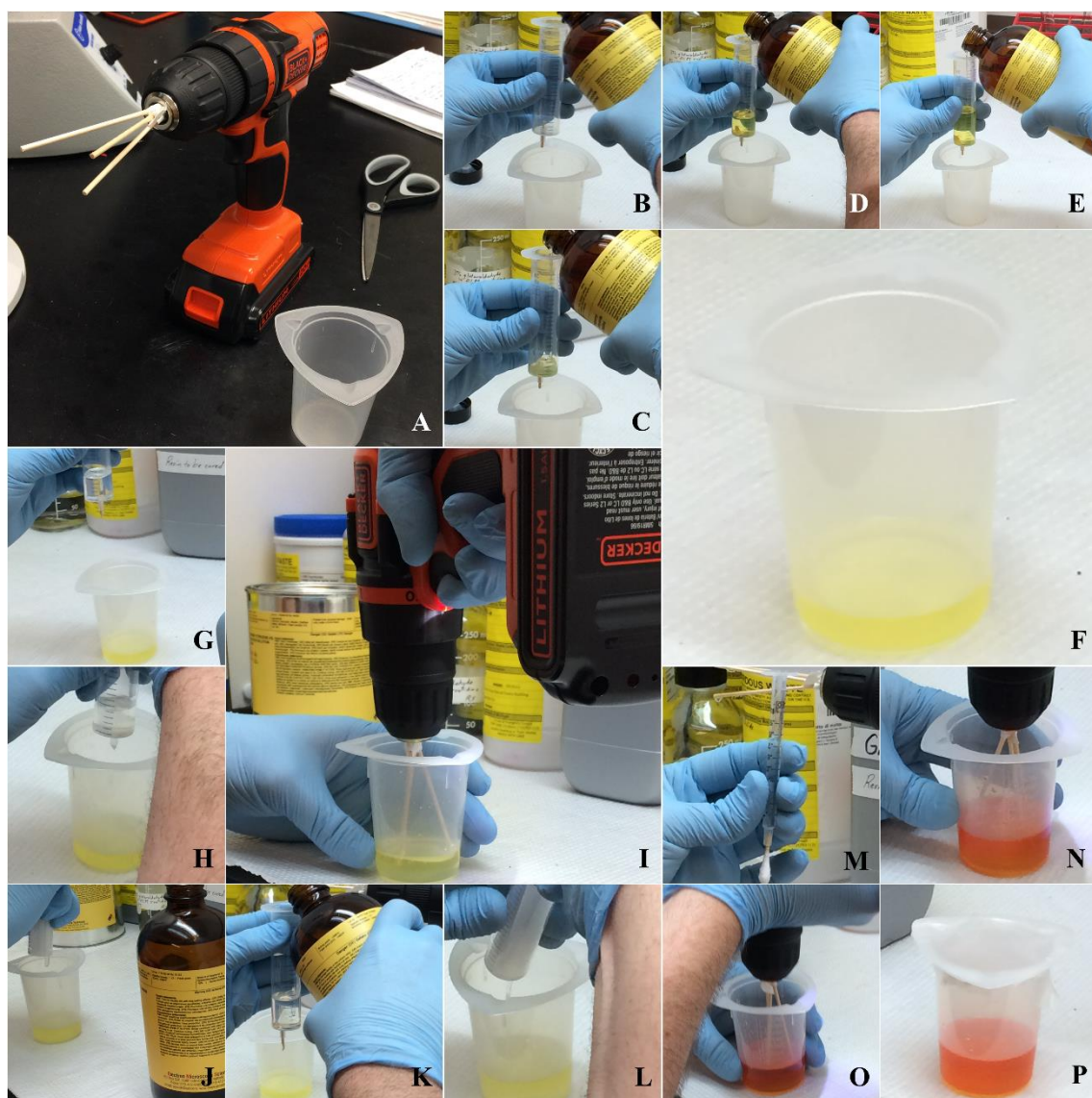


Figura 13A-P. Preparo da resina. A-F. Adição de DDSA. G-I. Adição de resina Epon 182. J-L. Adição de Araldite. M. Adição de dibutilftalato. O-P. Resina finalizada após adição de DMP 30

Infiltração dos blocos com series diluídas de resina (Fig. 14A-M): a resina EPOX é o material mais adequado para a preparação dos moldes finais, pois ela é solúvel em acetona e, além disso, é um material fácil de seccionar, além de ser relativamente estável em feixe de elétrons. O material desidratado (em acetona 100%) foi infiltrado em série graduada de resina EPOX de 25% (25% de resina, 75% de acetona) por 2 horas, 50% (50% de resina e 50% de acetona) e 75% (75% de resina, 25% de acetona) por 2 horas cada e 100% de resina durante a noite, para eliminar todos os vestígios de acetona.

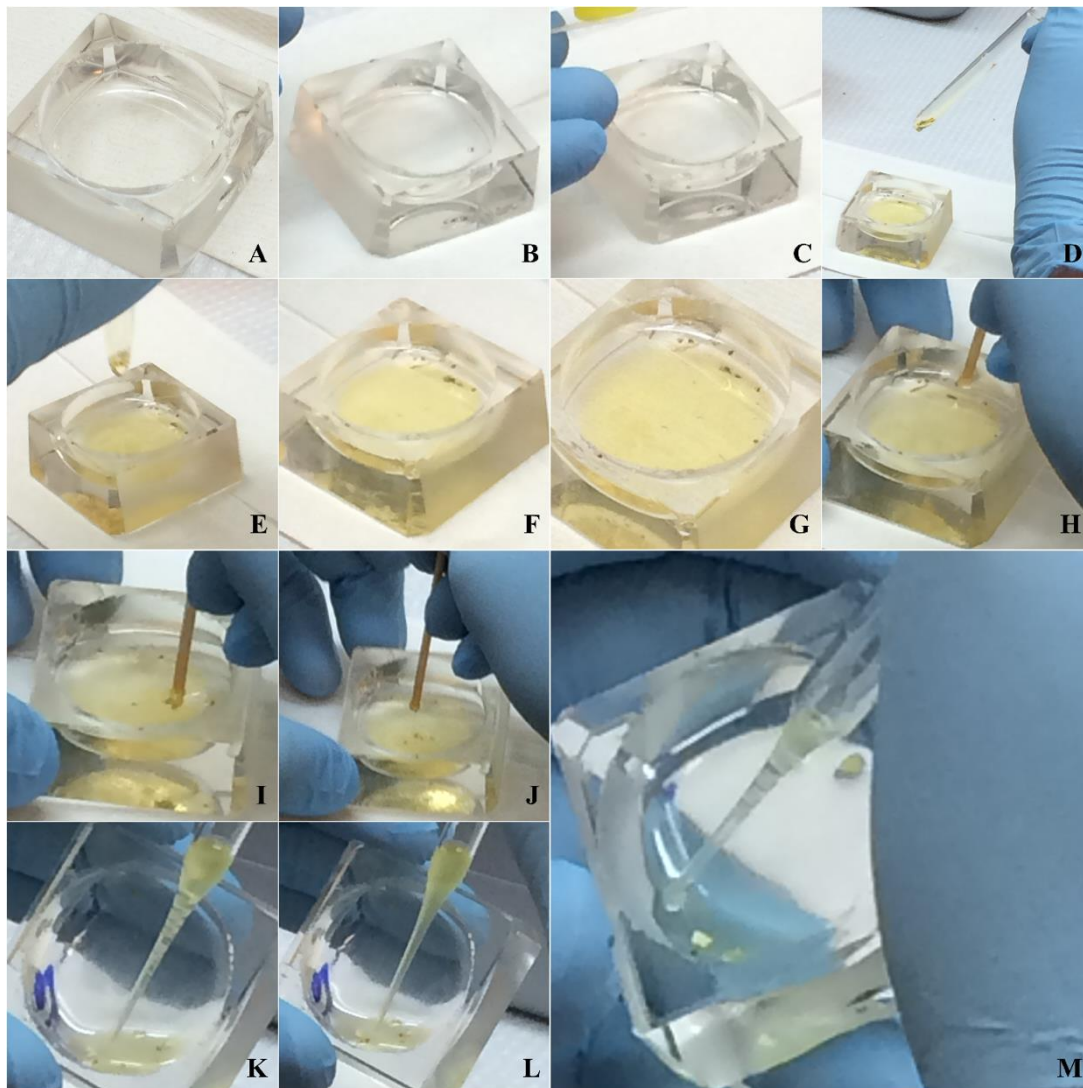


Figura 14 A-M. Infiltração dos blocos de ágar com diferentes diluições de resina

Preparo dos moldes (Fig. 15A-U): O material biológico totalmente infiltrado, bem como as legendas correspondentes e o molde de inclusão (Fig. 15A-U), foram colocados na máquina de vácuo durante a noite para remover quaisquer vestígios de bolhas de ar (Fig. 15D, E, F). Depois disso, o material biológico foi adicionado no molde, juntamente com

as legendas (Fig. 15G-Q) e então preenchido com resina Epon-Araldite recém-preparada (Fig. 15F), a qual foi posteriormente polimerizada durante 72 horas a 65°C. Os melhores blocos foram selecionados para serem seccionados (Fig. 15R-U).



Figura 15 A-U. Última etapa da preparação da resina e adição dos blocos de ágar nos moldes

Secção dos blocos moldados (Fig. 16 A-H): A secção dos blocos moldados foi realizada em um ultra micrótomo (Fig. 16A-H). O material foi inicialmente aparado (Fig. 16C-E) à mão, até formação de um trapézio de aproximadamente 0,1 mm. O bloco foi então aparado no ultra micrótomo (Fig. 16F) e depois cortado em secções de 80-120 nm, por uma faca de diamante. Estas secções em série foram recolhidas em anéis de níquel (malha 100-300) (Fig. 16G-H) para então serem coradas com citrato de chumbo a 2%.



Figura 16 A-H. Secção dos blocos moldados em um ultra micrótomo e adição das secções em anéis de níquel

Corando as secções (Fig. 17A-J): As secções foram então coradas durante 5 min em 2% de citrato de chumbo para obtenção de contraste. Depois disso, as secções foram lavadas duas vezes com água deionizada ultrapura para remoção de todos os vestígios de citrato de chumbo.

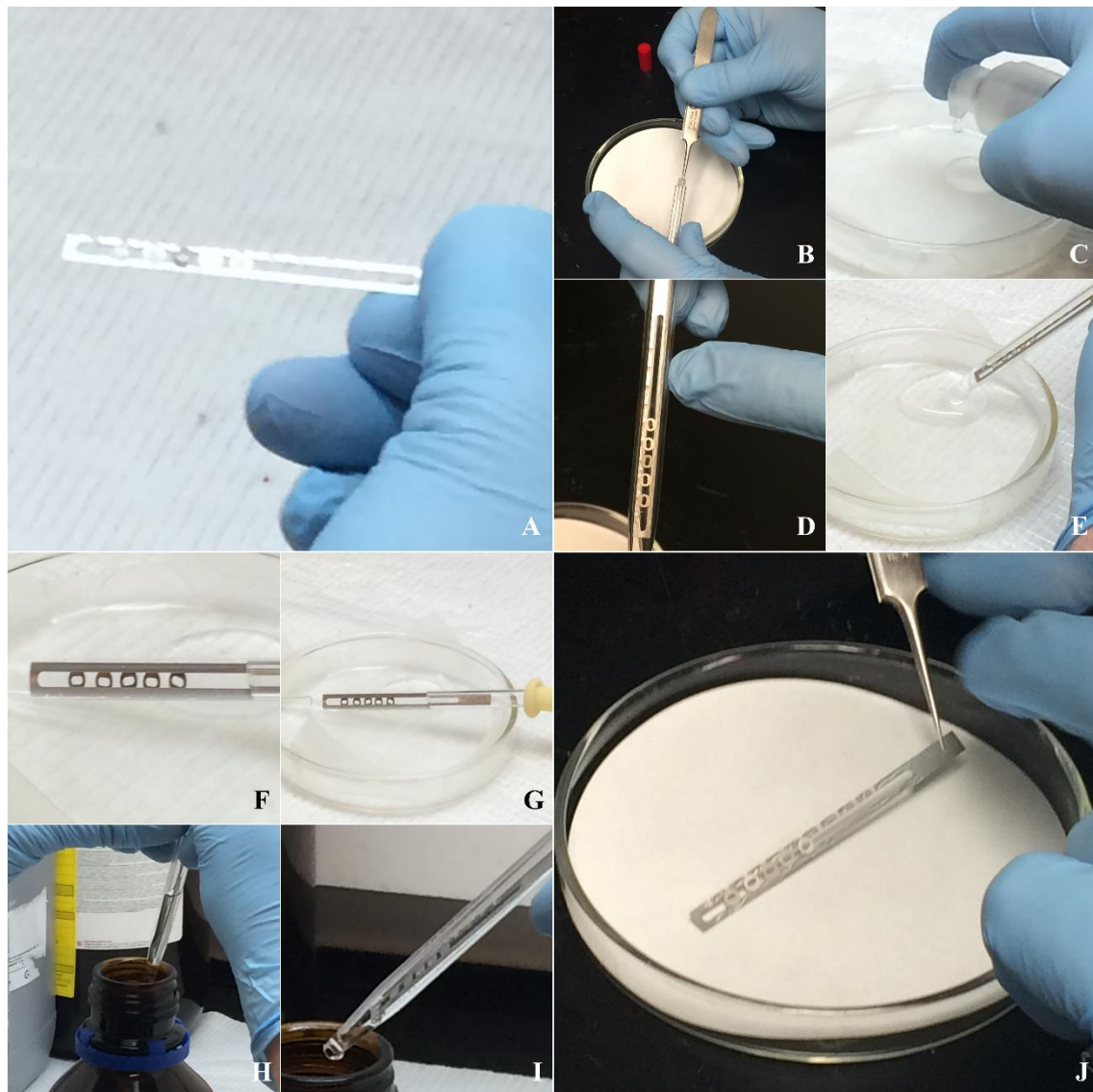


Figura 17 A-J. Corando as secções com 2% de citrato de chumbo

Análise por microscopia eletrônica de transmissão: Depois das secções totalmente secas, as mesmas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (modelo JEL-1400) a 80 kV. Secções aleatórias foram observadas para obtenção de imagens ultraestruturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amal, E. A., Aïcha, E. A. & Bernard, P.** 2005. *Achlya abortispora*, a new Oomycete isolated from water samples taken from a water reservoir in Morocco. *Current Microbiology* 53: 60-67.
- Amaral, A.M., Barbério, A., Voltolini, J.C. & Barros, L.** 2007. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste Allium (*Allium cepa*). *Revista Brasileira de Toxicologia* 20: 65-72.
- Birks, H.H. & Birks, H.J.** 2006. Multi-proxy studies in palaeolimnology. *Vegetation History Archaeobotany* 15: 235-251.
- Carlson, R.E.** 1977. A trophic state index for lakes. *Limnology and Oceanography*, 22: 361-369.
- CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura** (2018). Disponível online em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>. Acessado em 06 Junho de 2018.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2013. Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo. Parte 1. São Paulo, 301 p.
- Chen, M., Chen, F., Yu, Y., et al.** 2008. Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China. *Microbiology Ecology* 56: 572–583
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente.** 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. p. 23.
- Colins, C. & Willoughby, L.G.** 1962. The distribution of bacteria and fungal spores in Blelham Tarn with particular reference to an experimental overturn. *Archiv für Mikrobiologie* 43: 294-307.
- Cooke, W.B.** 1976. Fungi in sewage. In: Gareth Jones, E.B (Ed.). recent advances in Aquatic Mycology. London: Elek Science p. 389-434.
- Czczuga, B. Woronowicz, L., Brzozowska, K. & Chomutowska, H.** 1989. Studies of aquatic fungi IX. Mycoflora of different types springs. *Acta Hydrobiologica* 31: 273-283.
- Czczuga, B. Woronowicz, L., Brzozowska, K.** 1990a. Studies of aquatic fungi XII. Aquatic fungi of the lowland river Biebrza. *Acta Hydrobiologica* 26: 77-83.

- Czeczuga, B. Woronowicz, L., Brzozowska, K.** 1990b. Studies of aquatic fungi XIII. Mycoflora of river Czarna Hancza and its tributary, the river Marycha. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 75: 245-255.
- Czeczuga, B.** 1991a. Studies of aquatic fungi. Part XVI. Aquatic fungi of the river Pisa and its tributary, the river Skroda. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 19: 57-65.
- Czeczuga, B.** 1991b. Studies of aquatic fungi. Part XXII. Mycoflora of the river Wegorapa and its tributary, the river Goldapa-Jarka. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 19: 517-528.
- Czeczuga, B. & Woronowicz, L.** 1991. The lake Mamry complex. *Acta Mycologica* 27: 93-103.
- Czeczuga, B.** 1994. Studies of aquatic fungi. Part XVII. Aquatic fungi of Lake Hancza in the Suwalki Scenic Park and some adjacents lakes (northeastern Poland). *Acta Hydrobiologica* 36: 371-385.
- Czeczuga, B. & Muszynska, E.** 2001. Zoosporic fungi growing on Gymnosperm pollen in water of variety trophic state. *Polish Journal of Environmental Studies* 10: 89-94.
- Dawson, S.C. & Pace, N.R.** 2002. Novel Kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic enviroments. *Proceedings Natural Academic Sciences of USA* 99: 8324-8329.
- Esteves, F.A.** 2011. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro. Interciencia. 3 ed. 826p.
- FLONA – Floresta Nacional de Ipanema, Plano de Manejo.** 2016. Instituto Chico Mendes de Preservação da Biodiversidade.
- Gerphagnon, M., Latour, D., Colombet, J. & Sime-Ngando, T.** 2013. A double staining method using SYTOX green and calcofluor white for studing fungal parasites of phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* dx.doi.org/10.1128/AEM.00696-13.
- Gleason, F. H., Karpov, S.A., Lilje, O., Macarthur, D.J. et al.** 2014. In: Gareth Jones, E. B., Hyde, K. D. e Pang, K. (Eds.). *Zoosporic parasites of phytoplankton*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp.279-304.
- Goedkoop, W., Widenfalk, A., Haglund, A.L., et al.** 2005. Microbial characterization of artificial sediment and comparisons with natural sediments – implications for toxicity test. *Environmental Taxicological Chemistry* 24: 2725-2733.
- Golterman, H.L. & Clymo, R.S.** 1969. *Methods for chemical analysis of freshwaters*. Oxford and Edinburg: Blackwell Scientific Publications. International Biological Programme. 171p.

- Grossart, H.P. & Rojas-Jimenez, K.** 2016. Aquatic fungi: targeting a forgotten in microbial ecology. *Current opinion in Microbiology* 31: 140-145.
- 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.
- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Marano, A.V., et al.** 2015. Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea* 42: 135-163.
- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Rocha, S.C.O. Gonçalves, D.R. et al.** 2017. New insights into *Plectospira* genus (Oomycetes, Straminipila): morphological and molecular analysis. *Phytotaxa* 307: 191-198.
- 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.
- Kagami, M., Bruin, A., Ibelings, B.A. & Donk, E.V.** 2007. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia*: 578: 113-129.
- Kagami, M.; Helmsing, N. R.; Van Donk, E.** 2011. Parasitic chytrids could promote copepod survival by mediating material transfer from inedible diatoms. *Hydrobiologia* 659: 49-54.
- Kagami, M., Miki, T. & Takimoto, G.** 2014. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2014.00166.
- Karling, J. S.** 1977. *Chytridiomycetorum Iconographia*. Lubrecht & Cramer, Vaduz.
- Lamparelli, M.C.** 2004. Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 235 p.
- Lefèvre, E., Bardot, C., Noël, C., Carrias, J.F., Viscogliosi, E. et al.** 2007. Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeucaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environmental Microbiology*: 9: 61-71.
- Lefèvre, E., Letcher, P. & Powell, M.** 2012. Temporal variation of small eukaryotic community in two freshwater lakes: emphasis on zoosporic fungi. *Aquatic microbial Ecology* 67: 91-105.

- Lefranc, M., Thénot, A., Lepère, C. & Debroas, D.** 2005. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trofic status. *Application Environmental Microbiology* 71: 5935-5942.
- Lepère, C., Domaizon I. & Debroas, D.** 2008. Unexpected importance of potencial parasites in the composition of the freshwater small-eukaryote community. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1029-1041.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Churchill, P.F., Chambers, J.G.** 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898-915.
- Letcher, P.M., & Powell, M.J.** 2014. Hypothesized evolutionary trends in zoospore ultrastructural characters in Chytridiales (Chytridiomycota). *Mycologia*, 106: 379-396.
- Lucarotti, C.J.** 1981. Zoospore ultrastructure of *Nowakowskiella elegans* and *Cladochytrium replicatum* (Chytridiales). *Canadian Journal of Botany*, 59: 137-148.
- Lucinda, I.** 2003. Composição de Rotifera em corpos d'água da bacia do rio Tietê – São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. 199p.
- Marano, A.V., Zottarelli, C.L.A., Barrera, M.D. et al.** 2011. Diversity, role in decomposition, and sucession of zoosporic fungi and straminipiles on submerged decaying leaves in a woodland stream. *Hydrobiologia* 659: 93-109.
- Margalef, R.** 1983. *Limnologia*. Omega, Barcelona.
- McCune, B. & Mefford, M.J.** 2011. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 6. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA.
- 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.
- Monchy, S., Sanciú, G., Jobard, M., Rasconi. et al.** 2011. Exploring and quantifying fungal in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. *Environmental Biology* 13: 1433-1453.
- Müeller-Dombois, D. & Ellemberd, H.** 1974. Aims and methods of vegetation ecology. New York, Jonh Wiley & Sons. pp. 547.

- 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.
- Pedrazzi, F.J.M., Conceição, F.T., Sardinha, D.S., Moschini-Carlos, V. et al.** 2014. Avaliação da qualidade da água do reservatório de Itupararanga, Bacia do Alto Sorocaba. *Geociências* 33: 26-38.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1990. Levantamento dos fungos zoospóricos da Represa do Lobo ("Broa"), São Carlos, SP, Brasil [Master dissertation]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 175 p.
- Plaats-Niterink, V.J.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Micology* 21: 1-244.
- Pusceddu, A., Gambi, C., Manini, E. & Danovaro, R.** 2007. Trophic state, ecosystem efficiency and biodiversity of transitional aquatic ecosystems: analysis of environmental quality based on different benthic indicators. *Journal of Chemical Ecology* 23: 505-515.
- Rasconi, S. Jobard, M., Jouve, L. & Sime-Ngando, T.** 2009. Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2545–2553.
- Rasconi, S.; Niquil, N.; Sime-Ngando, T.** 2012. Phytoplankton chytridiomycosis: community structure and infectivity of fungal parasites in aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, Bedford, v. 14, p. 2151–2170.
- Rasconi, S., Grami, B., Niquil, N., Jobard, M. et al.** 2014. Parasitic chytrids sustain zooplankton growth during inedible algal bloom. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-20.
- Rocha, M. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2002. Chytridiomycota o Oomycota da represa do Guarapiranga. *Acta Botanica Brasilica* 16: 287-309.
- Rocha, M.** 2004. Micota zoospórica de lagos com diferentes trofias do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Microbiologia para o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, p. 1-85.
- Sartory & Groberlaar.** 1984. Extraction of chlorophyll-a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hidrobiologia* 114: 177-187.

- Secchin, L.F.** 2012. Caracterização ambiental e estimativa da produção de cargas difusas na área de drenagem da represa de Itupararanga. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo: São Paulo. 122p.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J. et al.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation* 16: 49-67.
- Sime-Ngando, T., Lèfevre, E. & Gleason, F.** 2011. Hidden diversity among aquatic heterotrophic flagellates: ecological potentials of zoosporic fungi. *Hydrobiologia* 659: 5-22.
- Slapeta, J., Moreira, D., Purificación, L.G.** 2005. The extend of protist diversity: insights from molecular ecology and freshwater. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 2073-2081.
- Smol, J.P.** 2008. Pollution of lakes and rivers: a paleoenvironmental perspective. Blackwell, 2 ed., Oxford University Press, New York.
- Sparrow, F. K.** 1968. The Fungi: An Advanced Treatise. *In*: Ainsworth, G.C. Sussman, A.S. (eds.). *The Fungal Population III*, Academic Press, New York.
- Tolmasquim, M.T.** 2012. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. *Estados Avuçados* 26: 247-260.
- Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T. & Tundisi, J.E.M.** 2008. Reservoirs and human well being: new challenges for evaluating impacts and benefits in the neotropics. *Brazilian Journal of Biology* 68: 1133-1135.
- Valderrama, G.C.** 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10: 109-122.
- Wurzbacher, C.M., Barlocher, F. & Grossart, H.P.** 2010. Fungi in lake ecosystems. *Aquatic microbial Ecology* 59: 125-149.
- Wurzbacher, C.M., Whartmann, N., Bourne, E., Attermeyer, K. et al.** 2016. High habitat-specific in fungal communities of oligo-mesotrophic temperate Lake Stechlin (North-West Germany). *Myckeys* 16: 17-44.
- Wetzel, R.G.** 2001. Structure and productivity of aquatic ecosystems. *In*: *Limnology*. Academic Press, San Diego, pp. 206.
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I. & Goedkoop, W.** 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – response at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* 152: 576-584.
- Wong, M.K.M., Goh, T.K., Hodgkiss, I.J. et al.** 1998. Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7: 1187-1206.

- Yang, X., & Hong, C.X.** 2015. Diversity and populations of *Phytophthora*, *Phytopythium* and *Pythium* species recovered from sediments in an agricultural run-off sedimentation reservoir. *Plant Pathology* 65: 1118-1125.
- 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.
- Zappia, R.E., Hüberli, D., Hardy, G.S.J. & Bayliss, K.L.** 2014. Fungi and oomycetes in open irrigation systems: knowledge gaps and biosecurity implications. *Plant Pathology* 63: 961-972.

CAPÍTULO 1

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE ORGANISMOS ZOOSPÓRICOS
HETEROTRÓFICOS (FUNGOS ZOOSPÓRICOS E OOMICETOS) DA
COLUNA D'ÁGUA E SEDIMENTO SUPERFICIAL DE RESERVATÓRIOS
COM DISTINTOS ESTADOS TRÓFICOS**

Estrutura da comunidade de organismos zoospóricos heterotróficos (fungos zoospóricos e oomicetos) da coluna d'água e sedimento superficial de reservatórios com distintos estados tróficos

Autores: Jerônimo, G.H¹. Ferragut, C². & Pires-Zottarelli, C.L.A¹.

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil, 04301-902

² Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil, 04301-902

RESUMO

Historicamente, a maior parte do conhecimento sobre a produtividade dos ecossistemas lênticos tem sido focada nos organismos autotróficos e produtores primários. Os decompositores e parasitas, embora apresentem um papel importante na dinâmica da cadeia alimentar, tem sido ao longo dos tempos negligenciados. Sequenciamentos de amostras ambientais tem revelado que os fungos basais (Blastocladiomycota e Chytridiomycota) representam a maior parte da micota presente nestes ecossistemas, sendo juntamente com os oomicetos, cruciais para a ciclagem de nutrientes. No entanto, pouco se sabe sobre a influência dos fatores ambientais sobre os padrões de ocorrência, frequência e abundância destes organismos. Diante disto, o objetivo deste estudo foi relacionar a riqueza e a abundância destes grupos de organismos com a sazonalidade e alguns fatores abióticos mensurados na coluna d'água e sedimento superficial de três reservatórios brasileiros (Santa Helena, Itupararanga e Hedberg), conhecidamente com distintos estados tróficos. Para isso, foram realizadas quatro coletas em cada reservatório, onde foram mensuradas algumas variáveis físicas e químicas da água (temperatura, pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, nitrogênio e fósforo total) e do sedimento superficial (nitrogênio total, fósforo total e carbono orgânico total). A estrutura da comunidade foi avaliada considerando-se a ocorrência, frequência e abundância dos táxons, mediante cálculo da riqueza de espécies, do índice de diversidade de Shannon, do índice de dominância de Simpson, da equitatividade e do índice de similaridade de Sørensen. Durante o estudo, 52 táxons de organismos zoospóricos heterotróficos foram identificados, sendo 25 deles representantes dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota (fungos zoospóricos) e 27 do filo Oomycota. Dentre os fungos zoospóricos, uma nova espécie do gênero *Nowakowskiella* J. Schröt foi descrita e o gênero *Avachytrium* Velez & Letcher relatado pela primeira vez para o Brasil, assim como *Plectospora gemmifera* Dreschler o foi dentre os oomicetos. Foi observada uma

comunidade diversa com poucos táxons dominantes, sendo a maior parte deles observada na estação chuvosa, dentre os quais, *Cladochytrium replicatum* Karling, *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor, *Aphanomyces* spp., *Dictyuchus* spp. e *Pythium* dos grupos P e T, foram os táxons mais frequentes e abundantes, considerando os reservatórios e estações (seca e chuvosa). Os organismos zoospóricos apresentaram uma ampla distribuição ao longo de diferentes gradientes tróficos, existindo espécies estritamente relacionadas aos locais com as mais altas concentrações de nitrogênio e fósforo total, e outras aos locais com as mais baixas concentrações destes nutrientes, e que potencialmente poderiam ser táxons indicativos da qualidade das águas. Concluímos, portanto, que os organismos zoospóricos heterotróficos são, no geral, tolerantes às amplas variações nas concentrações de nitrogênio e fósforo, mas alguns táxons são limitados pela disponibilidade destes nutrientes, particularmente o fósforo.

Palavras-chave: Blastocladiomycota, Chytridiomycota, ecologia, Oomycota

ABSTRACT

Historically, the most part of the knowledge about lentic ecosystems productivity has been based on autotrophic organisms and primary producers. The decomposers and parasites, although important in food chain dynamics, have been negligence in diversity studies. Environmental sequencing data have been revealed that the basal fungi (Blastocladiomycota e Chytridiomycota) compound the majority mycota in these ecosystems, and together with oomycetes, are crucial on nutrient cycling. However, a few is knowledge about the influence of the abiotic factors and seasonality on occurrence, frequency and abundance patterns of these organisms. Considering this, the aim of this study was to relate the species richness and abundance of these groups with seasonality and some abiotic factors measured in the water column and surface sediment of three Brazilian reservoirs (Santa Helena, Itupararanga and Hedberg), with distinctive trophic states. In order to do this, four sampling were performed in each reservoir, in which physical and chemical variables of the water (temperature, pH, electrical conductivity, dissolved oxygen, nitrogen and total phosphorus) and surface sediment (total nitrogen, total phosphorus and total organic carbon) were measured. The community structure was evaluated considering the abundance, frequency, species richness, Shannon's diversity index, Simpson's index, Evenness and similarity Sorensen index. During the study, 52 taxa of heterotrophic zoosporic organisms were identified, 25 of which representative of

Blastocladiomycota and Chytridiomycota phyla (zoosporic fungi) and 27 of Oomycota phylum. On the zoosporic fungi, a new species of the *Nowakowskiella* J. Schröt genus was described and *Avachytrium* Velez & Letcher reported for the first time in Brazil, as well as *Plectospora gemmifera* Drechsler to the Oomycota. We observed a diverse community with few dominant taxa, which occurred predominantly at rainy season, being *Cladochytrium replicatum* Karling, *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor, *Aphanomyces* spp., *Dictyuchus* spp. and *Pythium* group P and T, the most frequent and abundant, considering the reservoirs and seasons (dry and rainy). Zoosporic organisms presented a wide distribution along different trophic gradients, with species strictly related to locals with high concentrations of nitrogen and total phosphorus, and others with low concentrations of these nutrients, which could potentially be taxa indicative of quality of water. We conclude that heterotrophic zoosporic organisms are, in general, tolerant to wide variations in nitrogen and phosphorus concentrations, but some taxa are limited by the availability of these nutrients, particularly phosphorus.

Key words: Blastocladiomycota, Chytridiomycota, ecology, Oomycota

INTRODUÇÃO

Os organismos zoospóricos heterotróficos dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota possuem como similaridade a produção de esporos flagelados (zoósporos), os quais os permitem se dispersarem ativamente em ecossistemas aquáticos e terrestres úmidos. Nestes ambientes atuam como decompositores de matéria orgânica ou como parasitas de diferentes grupos de hospedeiros, exercendo importante papel na ciclagem do carbono nos ecossistemas (Shearer *et al.* 2007, Sime-Ngando *et al.* 2010, Wurzbacher *et al.* 2016).

Os ambientes aquáticos lênticos, em especial os reservatórios, possuem grande importância devido aos diversos serviços que prestam à população, principalmente no que se refere ao abastecimento público e geração de energia elétrica, sendo a hidroeletricidade a principal fonte de energia do país e responsável por 75% do total de energia produzida (Tolmasquim 2012). No entanto, sua construção gera importantes, e muitas vezes, irreversíveis impactos, como a perda da biodiversidade e da qualidade da água e mudanças socioeconômicas regionais (Tundisi *et al.* 2008). Dentre os diversos impactos antrópicos gerados, a eutrofização e o uso desordenado do solo da bacia hidrográfica, são as variáveis que frequentemente têm sido associadas com a perda da qualidade da água e da biodiversidade (Pusceddu *et al.* 2007). O processo de eutrofização tem sido bastante investigado por representar uma das principais causas de alterações na qualidade da água e redução da diversidade em águas continentais (Margalef 1983). Este processo geralmente associado ao aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, tem como consequência o aumento de suas produtividades (Esteves 1998). Já os tipos de usos e a ocupação do solo na bacia hidrográfica possuem relações significativas no que diz respeito às diversas substâncias químicas lançadas nos corpos d'água, como efluentes domésticos, industriais e agrícolas, expondo diversos organismos a uma grande variedade de compostos mutagênicos e citotóxicos (Amaral *et al.* 2007).

Nos reservatórios essas alterações ecológicas podem ser detectadas a partir do monitoramento da água e do sedimento acumulado, seja este superficial ou depositado em camadas (Birks & Birks 2006). A análise do sedimento fornece dados cumulativos e constitui um arquivo de informações de natureza biogeoquímica, uma vez que as camadas de deposição temporais se encontram sequencialmente acumuladas (Mozeto 2004). Assim, o sedimento superficial representa uma amostra espacial e temporalmente integrada dos eventos que se acumularam no passado recente (Smol 2008). O oxigênio,

se presente, está restrito as camadas superficiais do perfil sedimentar, e por isso, os fungos presentes neste compartimento geralmente apresentam adaptações fisiológicas (mecanismo fermentativo) e/ou morfológicas (esporos de resistência) para suportar tais limitações (Wurzbacher *et al.* 2010). As leveduras e os representantes do filo Chytridiomycota são considerados os grupos de fungos mais ativos no perfil sedimentar de reservatórios (Slapeta *et al.* 2005), e técnicas de PFLA (Análise automática de ácidos graxos e fosfolípidos) (Goedkoop *et al.* 2005, Widenfalk *et al.* 2008) e clonagem (Dawson & Pace 2002, Luo *et al.* 2005), indicam estes dois grupos como micota dominante nos sedimentos de lagos e reservatórios, com tendência de maior diversidade de espécies nos sedimentos localizados próximos as zonas litorâneas (Collins & Willoughby 1962, Sparrow 1968). Além disso, assim como os fungos zoospóricos, alguns poucos estudos têm apontado a importância dos oomicetos nos processos de transferência de energia no sedimento, sendo alguns gêneros, tais como *Aphanomyces* spp. e *Pythium* spp., considerados abundantes e ubíquos nas camadas superficiais do perfil sedimentar (Sparrow 1968, Boopathi *et al.* 2015, Yang & Hong, 2015, Wurzbacher *et al.* 2016). No entanto, considerando a totalidade dos estudos desenvolvidos em reservatórios, somente pouco deles analisaram a diversidade destes grupos de organismos no sedimento superficial, sendo no Brasil estes relatos inexistentes.

Embora as atuais técnicas de clonagem indiquem os fungos zoospóricos como micota dominante de lagos e reservatórios, os fatores que afetam a variação temporal e a estrutura da comunidade ainda permanecem pouco investigados (Wurzbacher *et al.* 2016). De maneira geral, quando consideramos os fungos zoospóricos e oomicetos, a relação entre os padrões de ocorrência e distribuição em ambientes com diferentes trofias, ainda é pouco explorada em escala global (Cooke 1976, Czekuga *et al.* 1989, 1990a,b, Czekuga 1991a,b, Czekuga & Woronowicz 1991, Lefranc *et al.* 2005, Chen *et al.* 2008, Marano *et al.* 2011, Monchy *et al.* 2011), e principalmente no Brasil (Rocha 2004). Muitos dos estudos conduzidos em ambientes com diferentes estados tróficos (Tan & Lim 1983, 1984, Czekuga 1994, Rancovic 1998, Czekuga & Muszynska 2001) listam principalmente a diversidade em espécies, não relacionando os padrões de sua ocorrência e distribuição com fatores abióticos. Czekuga *et al.* (1990a,b) e Czekuga (1991a,b) apontam estes organismos como tolerantes e adaptados a diferentes níveis de poluição orgânica, mas relata preferência dos mesmos por ambientes menos poluídos e ricos em matéria orgânica. Lefranc *et al.* (2005), Chen *et al.* (2008), Lepère *et al.* (2008), Monchy *et al.* (2011) e Wurzbacher *et al.* (2010, 2016) apontam, por meio de análises moleculares,

que a diversidade tende a ser menor em águas mais produtivas, sendo os reservatórios oligotróficos e mesotróficos os que normalmente apresentam maior diversidade. Lefèvre *et al.* (2012) mostraram maior diversidade de quitrídias em reservatórios meso-eutróficos do que em ambientes oligotróficos, sugerindo que ambientes em estado trófico intermediário (mesotróficos) sejam os mais propícios para ocorrência destes fungos. Para o Brasil, Rocha (2004) sugeriu que a riqueza em espécies dos fungos zoospóricos e oomicetos dos lagos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), com distintas trofias (mesotrófico e eutrófico), apresentou correlação negativa com as concentrações de nitrogênio e fósforo, tendo sido demonstrada e comprovada a natureza limáfoba ou limaxena destes organismos. A autora pontua também que a ausência dos mesmos em locais amostrados com altíssimas concentrações de nitrogênio e fósforo total indica a sua possível utilização como bioindicadores de poluição, estando os mesmos completamente ausentes em tal situação.

Com relação aos padrões sazonais de distribuição desses organismos zoospóricos em ecossistemas lênticos, verifica-se uma grande escassez de estudos. Em regiões temperadas se estabelece normalmente o período chuvoso como o de maior diversidade (Czeczuga 1986, 1995, Czeczuga *et al.* 2010). Em regiões tropicais, os únicos estudos a abordarem a sazonalidade em ecossistemas lênticos brasileiros foram os de Pires-Zottarelli (1990) e Rocha (2004), os quais também apontaram ser a maior diversidade encontrada durante a estação chuvosa.

Mesmo diante da expressiva frequência e importância destes organismos zoospóricos nos processos de transferência de energia nos ecossistemas aquáticos, estudos abordando sua diversidade e importância em reservatórios do Brasil ainda são escassos, podendo ser resumidos aos trabalhos de Rocha & Merighi (1986) na Represa Billings, Pires-Zottarelli (1990) na Represa do Lobo, Rocha & Pires-Zottarelli (2002) na Represa do Guarapiranga e Rocha (2004) nos Lagos das Garças e das Ninfeias do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), no entanto, somente o último discute de forma mais aprofundada a influência dos fatores abióticos sobre os padrões de ocorrência destes organismos. Dos 121 táxons de Chytridiomycota e 18 de Blastocladiomycota conhecidos no Brasil (Lista de espécies da Flora do Brasil 2014), aproximadamente 79% foram relatados para ecossistemas lóticos (rios, riachos e cachoeiras) e solos, principalmente em áreas de Mata Atlântica (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), sendo a diversidade em reservatórios representada por somente 21% das espécies conhecidas no país. Este mesmo cenário pode também ser atribuído para o filo Oomycota, que possui somente 19,5% da diversidade relatada para ecossistemas lênticos (Rocha & Merighi 1986; Pires-Zottarelli, 1990; Rocha & Pires-Zottarelli, 2002; Rocha, 2004), com maior representatividade dos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Pythium* e *Saprolegnia*.

Com isso, o objetivo deste estudo foi investigar a influência dos fatores abióticos sobre os padrões de ocorrência, frequência e abundância dos organismos zoospóricos heterotróficos (Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota) em três reservatórios tropicais com distintos estados tróficos. Além disso, baseado nos escassos relatos destes grupos nas camadas sedimentares, esperamos encontrar uma maior diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos na coluna d'água, comparado ao sedimento superficial, assim como durante a estação chuvosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e mensuração dos fatores abióticos

Três reservatórios, localizados na bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê (UGRHI10), foram selecionados considerando-se seus distintos estados tróficos e características morfométricas (Tabela 1).

Tabela 1. Características morfométricas dos três reservatórios localizados na bacia hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê (UGRHI 10).

Reservatórios	Ano construção	Estado trófico	Prof. máx. (m)	Prof. méd.(m)	Vol. máx. (m³)	Área (km²)	Tempo residência da água	Área de proteção	Utilização
St. Helena	1938 ^(f)	Oligotrófico ^(a)	10,5 ^(a)	-	-	-	-	Não inclusa	Geração de energia elétrica
Hedberg	1811 ^(c)	Eutrófico ^(d)	-	4,0 ^(c)	-	0.113 ^(c)	-	“FLONA de Ipanema” ^(c)	Paisagismo, pesquisa e educação ambiental ^(c)
Itupararanga	1912 ^(b)	Mesotrófico ^(d)	19 ^(d)	7,8 ^(b)	286 milhões ^(e)	936,51 ^(e)	4-13 meses ^(b)	APA de Itupararanga ^(b)	Abastecimento público ^(e)

a: Lucinda (2003); b: Secchin (2012); c: Plano de manejo - FLONA (2016); d: Projeto Acquased; e: Pedrazzi *et al.* (2014); f: Eletromemoria-USP 2015; (-): informação indisponível.

Durante o estudo, quatro coletas foram realizadas, duas na estação seca (agosto/2014 e julho/2015) e duas na chuvosa (dezembro/2014 e março/2015), para as quais foram obtidos os dados mensais de precipitação e temperatura. Onze pontos de

coleta foram selecionados nas zonas pelágicas destes reservatórios, considerando-se a entrada dos principais tributários, as estações de captação de água, bem como a posição da barragem (Tabela 2).

Tabela 2. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta nos três reservatórios da bacia do Sorocaba/Médio Tietê.

Reservatórios	Pontos	Coordenadas	
		Sul	Oeste
Santa Helena	1	23°34'49,92"	47°25'32,64"
	2	23°34'58,56"	47°25'50,52"
	3	23°34'54,30"	47°26'12,12"
Hedberg	1	23°25'55,86"	47°35'33,06"
	2	23°25'40,86"	47°35'31,14"
	3	23°25'33,72"	47°35'42,66"
Itupararanga	1	23°37'11,58"	47°13'59,34"
	2	23°36'51,96"	47°18'50,22"
	3	23°37'12,96"	47°19'37,20"
	4	23°38'50,36"	47°22'14,52"
	5	23°36'53,10"	47°23'34,70"

Em cada ponto de coleta foram amostradas diferentes profundidades da coluna d'água (superfície, meio e fundo), para as quais, foram mensurados os seguintes fatores abióticos: temperatura, pH, condutividade (sonda Horiba U-51), oxigênio dissolvido pelo método de Winkler modificado (Golterman & Clymo 1969), nitrogênio total e fósforo total (Valderrama 1981), clorofila-a (Sartory & Grobelaar 1984) e profundidade de desaparecimento do disco de Secchi. Além disso, amostras de sedimento superficial (2 cm superficiais), foram coletadas e o carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total estimados (Valderrama 1981, Andersen 1976).

Iscaagem, isolamento e identificação morfológica e molecular dos espécimes

Em laboratório as amostras de diferentes profundidades da coluna d'água, bem como as de sedimento superficial, foram iscadas com substratos celulósicos, queratinosos e quitinosos (grãos de pólen de *Pinus* sp., epiderme de cebola, palha de milho, celofane, sementes de *Sorghum* sp., ecdise de cobra e exoesqueleto de camarão), conforme metodologia descrita em Milanez *et al.* (1989).

Estruturas assexuadas (zoosporângios, zoósporos e esporos de resistência) e sexuadas (anterídios, oogônios e oósporos) foram analisadas, considerando-se o tipo de desenvolvimento, formato, tamanho, ornamentação, e utilizadas para a identificação morfológica dos espécimes.

Análises de Máxima Verossimilhança de diferentes regiões do DNA (18S, ITS, 28S e COX1), foram utilizadas para corroborar as identificações morfológicas ou então identificar os isolados nos quais não foram observadas estruturas sexuadas, imprescindíveis para a identificação em nível de espécie. Os táxons isolados em meio cultura e incluídos em análises filogenéticas, para os quais não foi possível a identificação em nível específico, foram considerados como táxons distintos (especialmente as do gênero *Pythium*) com base nas diferenças moleculares e morfológicas.

Análises estatísticas e índices de diversidade

A abundância (A) foi determinada com base no número de ocorrências, considerando a presença ou ausência dos táxons em cada tipo de isca, nas diferentes profundidades da coluna d'água (superfície, meio e fundo) e sedimento superficial (Nascimento *et al.* 2011, adaptado). A frequência de ocorrência foi calculada em cada estação (seca ou chuvosa) considerando-se: (número de amostras colonizadas por um determinado táxon/número de amostras analisadas) \times 100.

A estrutura da comunidade nas diferentes estações (seca e chuvosa) foi caracterizada pela: (i) riqueza de espécies (S); (ii) Índice de diversidade de Shannon: (H') = $-\sum p_i \ln p_i$, onde p_i é a abundância da espécie i na comunidade; (iii) Equitatividade (E) = H'/H_{\max}' , em que H_{\max}' é o valor máximo de diversidade para o número de táxons presentes; (iv) Índice de dominância de Simpson: (D) = $1 / \sum (p_i)^2$ baseado na abundância dos táxons (Zak & Willig 2004); e (v) Índice de similaridade de Sorensen, utilizado para comparar a composição dos táxons entre as estações (seca e chuvosa) e compartimentos (coluna d'água e sedimento superficial), sendo $SI = [2c/(a + b)] \times 100$, onde “c” é o número de táxons comuns em ambas as estações ou compartimentos, “a” é o número de

táxons exclusivos da estação seca ou coluna d'água e “b” é o número de táxons exclusivos da estação chuvosa ou sedimento superficial (Müeller-Dombois & Ellemberd 1974).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para ordenar os dados abióticos a partir de uma matriz de correlação, onde os dados foram transformados para $\log(x+1)$, exceto pelo pH. As PCoAs dos dados bióticos da coluna d'água e sedimento superficial foram calculadas com base na distância euclidiana com base na riqueza dos táxons, para os quais foram desconsiderados os táxons com apenas uma ocorrência ao longo do estudo. Ambas as análises, assim como a transformação, foram realizadas no programa PC-ORD 6.0 (McCune & Mefford 2011).

O teste t de "student" foi aplicado para verificar a existência de diferenças significativas dentre os fatores abióticos mensurados nas diferentes estações e reservatórios, bem como para os índices de diversidade, para o qual os dados foram normalizados quando os mesmos não apresentavam uma distribuição normal. Foram considerados resultados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

Índice de estado trófico (IET)

O cálculo do índice de estado trófico (IET) dos reservatórios foi baseado nas concentrações de fósforo total e clorofila-a (Lamparelli 2004). Os valores da profundidade do disco de Secchi não foram considerados para o cálculo do IET, já que este pode não refletir a biomassa algal, mas o material inorgânico dissolvido na coluna d'água (Cetesb 2013).

RESULTADOS & DISCUSSÃO

Dados climatológicos

O período de estudo compreendeu os anos de 2014 e 2015, os quais foram atipicamente de baixa pluviosidade. De acordo com os dados do Cepagri (2018), as médias mensais de precipitação durante os meses amostrados, para o município de Votorantim (onde está inserido o reservatório de Santa Helena - Fig. 1A), foram muito abaixo das médias históricas mensais para março (133,7 mm), julho (35,6 mm), agosto (39,1 mm) e dezembro (191,7 mm), o mesmo sendo observado para os de Itupararanga (141,2 mm em março, 44,7 mm em julho, 40 mm em agosto e 175,6 mm em dezembro), localizado em Ibiúna, e Hedberg (141,0 mm em março, 56,1 mm em julho, 36 mm em

agosto e 190,3 mm em dezembro) em Iperó (Fig. 1B-C). Já as médias de temperatura estão de acordo com as médias históricas observadas para os meses amostrados.

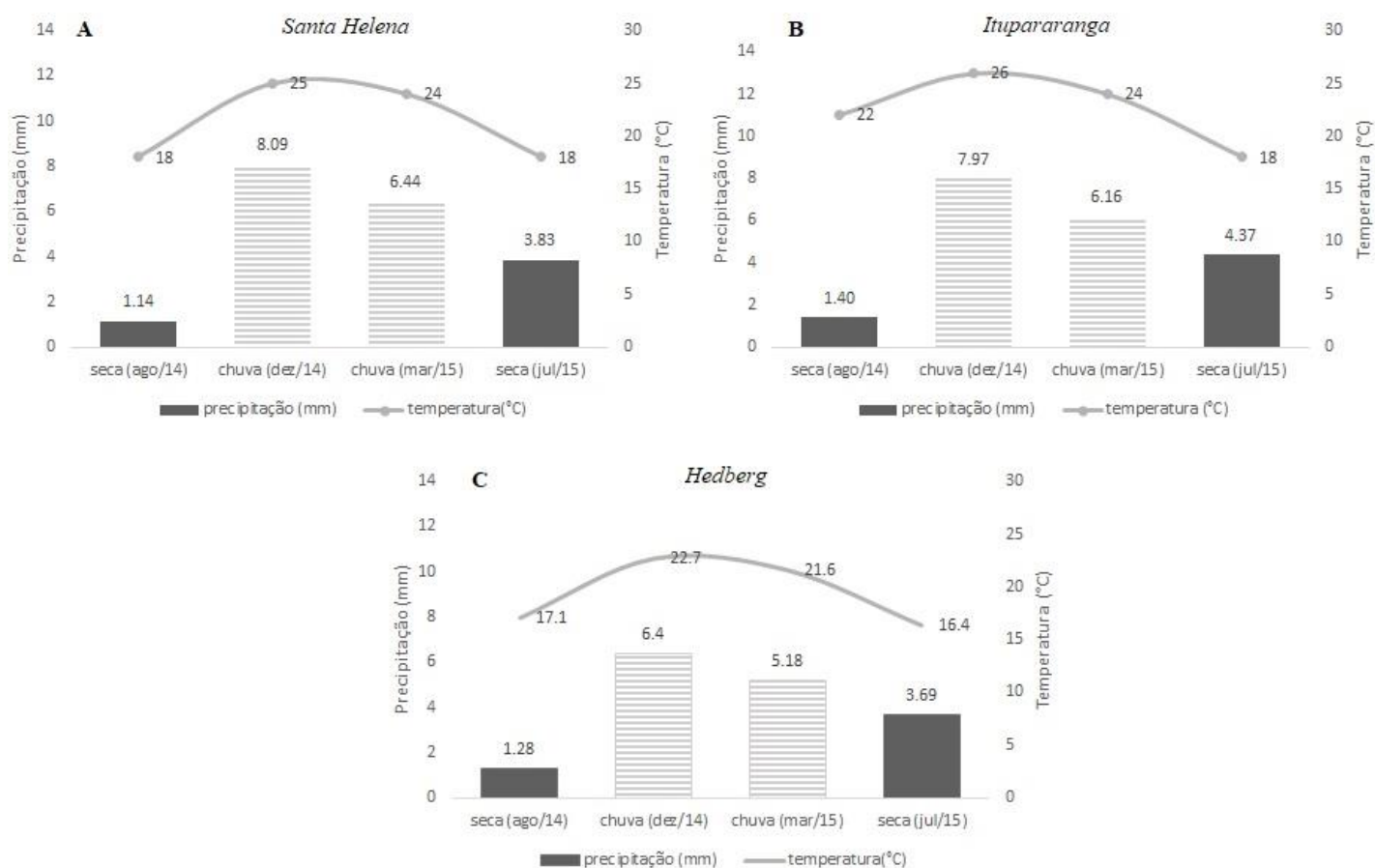


Figura 1. Médias mensais de precipitação (mm) e temperatura (°C) nos reservatórios de Santa Helena (A), Itupararanga (B) e Hedberg (C) durante as amostragens.

Fatores abióticos da coluna d'água

Na análise de componentes principais, os dois primeiros eixos explicaram 63,4% da variabilidade total dos dados (Fig. 2). O eixo 1, explicou a maior parte da variabilidade dos dados (38,8%), sendo o fósforo total (PT) ($r = -0,47$) e o nitrogênio total (NT) ($r = -0,45$) as variáveis que mais influenciaram a variabilidade neste eixo. Independentemente da estação, maior parte das unidades amostrais de Santa Helena e Itupararanga se agruparam no lado positivo do eixo 1, relacionadas às mais baixas concentrações de PT e NT, enquanto as de Hedberg se agruparam no lado negativo deste eixo. O eixo 2 explicou 24,6% da variabilidade dos dados, sendo a temperatura ($r = -0,60$) no lado negativo e o oxigênio dissolvido ($r = 0,53$) no lado positivo, as variáveis que mais

influenciaram a variabilidade dos dados. Todas as unidades amostrais da estação seca, exceto pelo ponto 1 do reservatório Hedberg (Hsec1), se agruparam no lado positivo deste eixo, enquanto as da estação chuvosa, se agruparam no lado negativo deste eixo. Portanto, o eixo 1 representa um gradiente trófico, enquanto o eixo 2 um gradiente sazonal.

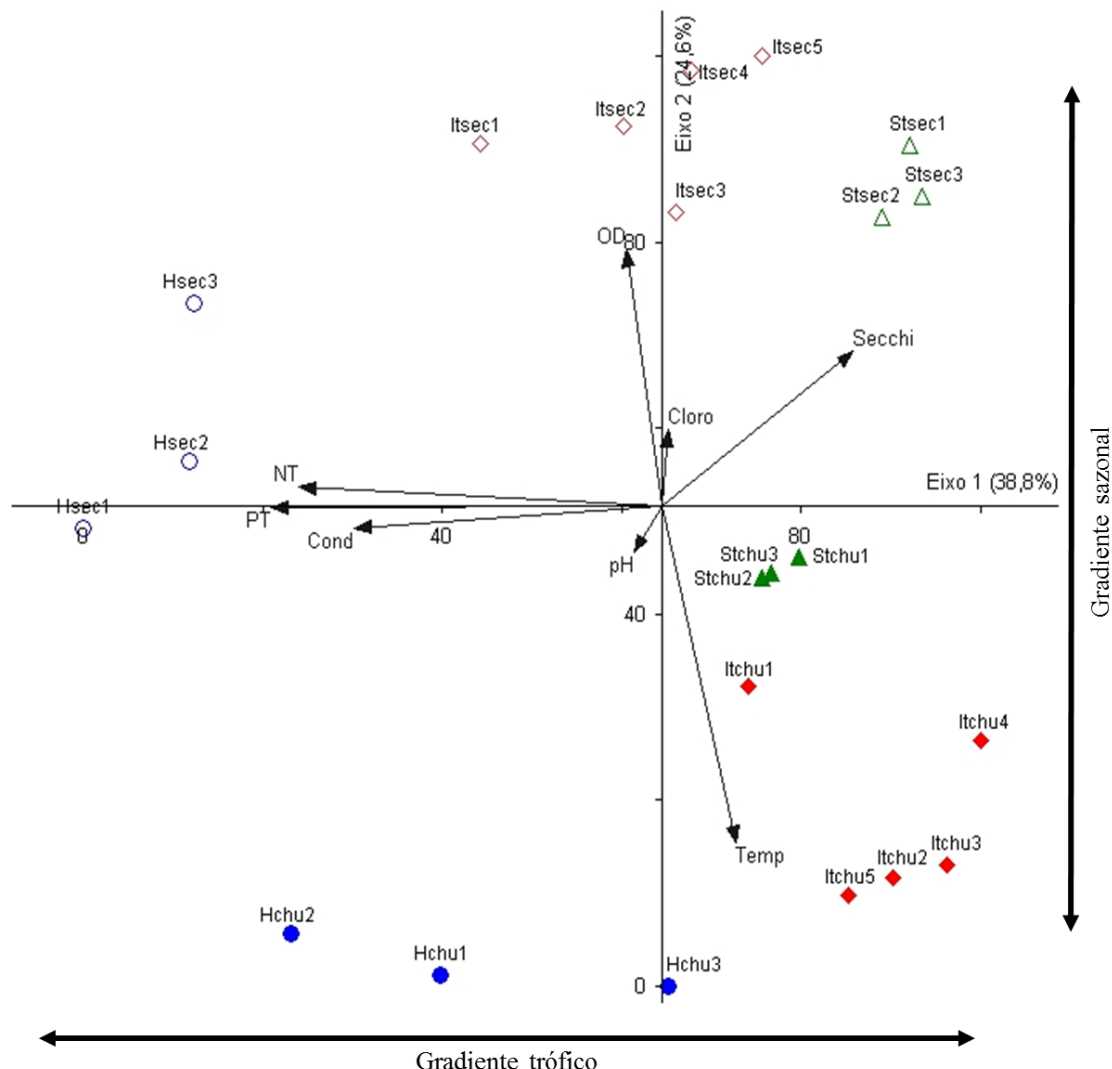


Figura 2. Ordenação das variáveis abióticas na análise de componentes principais (PCA) mensurados na coluna d'água. O eixo 1 representa um gradiente trófico enquanto o eixo 2 um gradiente sazonal. Legenda: **Cloro**: clorofila-a; **Cond**: Condutividade; **NT**: Nitrogênio total; **OD**: Oxigênio dissolvido; **PT**: fósforo total; **Secchi**: transparência do disco de Secchi; **Temp**: temperatura. **Stsec1**: Santa Helena seca ponto 1; **Stsec2**: Santa Helena seca ponto 2; **Stsec3**: Santa Helena seca ponto 3; **Stchu1**: Santa Helena chuvosa ponto 1; **Stchu2**: Santa Helena chuvosa ponto 2; **Stchu3**: Santa Helena chuvosa ponto 3; **Hsec1**: Hedberg seca ponto 1; **Hsec2**: Hedberg seca ponto 2; **Hsec3**: Hedberg seca ponto 3; **Hchu1**: Hedberg chuvosa ponto 1; **Hchu2**: Hedberg chuvosa ponto 2; **Hchu3**: Hedberg chuvosa ponto 3; **Itsec1**: Ituparanga seca ponto 1; **Itsec2**: Ituparanga seca ponto 2; **Itsec3**: Ituparanga seca ponto 3; **Itsec4**: Ituparanga seca ponto 4; **Itsec5**: Ituparanga seca ponto 5; **Itchu1**: Ituparanga chuvosa ponto 1; **Itchu2**: Ituparanga chuvosa ponto 2; **Itchu3**: Ituparanga chuvosa ponto 3; **Itchu4**: Ituparanga chuvosa ponto 4; **Itchu5**: Ituparanga chuvosa ponto 5.

Durante as amostragens foram observadas mudanças pontuais no estado trófico dos reservatórios, quando comparados aos dados de literatura (Tab. 1). As concentrações de fósforo total e a clorofila-a apresentaram uma ampla variação nas diferentes estações e reservatórios, no entanto, estes últimos foram predominantemente mesotróficos durante o período de estudo, exceto por Hedberg na estação seca (ago/14), o qual foi eutrófico e Santa Helena no mesmo período (ago/14), onde foi observada condição oligotrófia (Fig. 3).

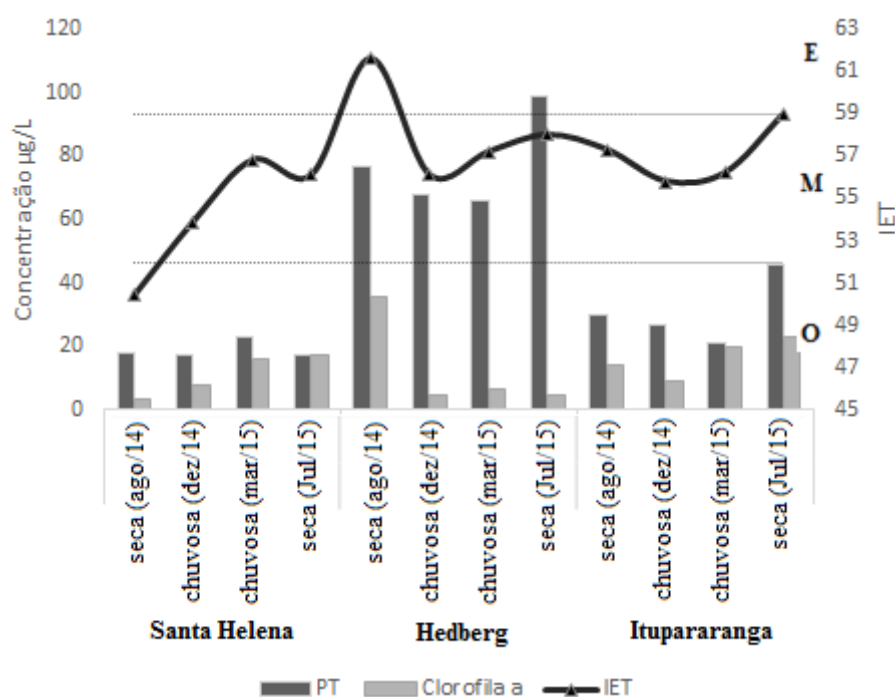


Figura 3. Concentração de clorofila-a e fósforo total e atribuição do índice de estado trófico nas estações seca e chuvosa. E: Eutrófico; M: Mesotrófico; O: Oligotrófico. Classificação de trofia baseado em Lamparelli (2004).

A variação dos fatores abióticos mensurados na coluna d'água está representada na tabela 3 e figura 4 (A-H). De acordo com o teste t ($p \leq 0,05$), foram observadas diferenças significativas entre estações ou reservatórios nas concentrações de fósforo total (PT), nitrogênio total (NT), transparência da água (disco de Secchi), condutividade, temperatura e oxigênio dissolvido.

Tabela 3. Valores máximos e mínimos (média \pm desvio padrão) das variáveis abióticas mensuradas durante as estações seca e chuvosa nos três reservatórios estudados.

Variáveis	St. Helena		Hedberg		Itupararanga	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
	min-máx (méd. \pm DP)	min-máx (méd. \pm DP)	min-máx (méd. \pm DP)	min-máx (méd. \pm DP)	min-máx (méd. \pm DP)	min-máx (méd. \pm DP)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	16,3-21,0 (18,0 \pm 1,2)	20,8-24,0 (22,9 \pm 0,9)	13,1-20,2 (17,1 \pm 2,1)	20,7-21,9 (22,6 \pm 2,4)	15,2-19,4 (17,0 \pm 0,9)	21,2-26,8 (24,1 \pm 1,7)
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	67,0-106,0 (89,0 \pm 12,4)	97,0-119,0 (107,9 \pm 7,9)	111-175 (139,6 \pm 22,6)	26,0-244,0 (114,1 \pm 51,4)	73,0-126,0 (96,3 \pm 14,2)	33,0-200,0 (94,7 \pm 29,7)
NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	330,2-632,7 (523,0 \pm 89,9)	384,9-1035,0 (660,3 \pm 156,4)	1157,0-1764,6 (1346,7 \pm 182,0)	212,9-1154,9 (831,2 \pm 254,5)	666,3-1107,4 (890,1 \pm 110,4)	307,2-1207,8 (543,7 \pm 202,0)
PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	13,3-20,4 (17,0 \pm 2,4)	15,4-25,9 (19,8 \pm 3,6)	49,2-123,8 (87,9 \pm 17,6)	30,3-95,1 (67,2 \pm 21,3)	19,5-64,9 (38,2 \pm 12,5)	11,4-69,9 (24,0 \pm 15,8)
pH	4,9-7,4 (7,0 \pm 0,7)	5,7-8,3 (7,2 \pm 0,7)	6,2-9,4 (7,6 \pm 1,1)	5,4-7,2 (6,4 \pm 0,6)	4,4-7,6 (6,1 \pm 0,9)	6,2-8,7 (7,1 \pm 0,7)
OD (mg L^{-1})	5,5-8,2 (7,0 \pm 0,7)	1,8-9,1 (6,0 \pm 0,8)	2,9-10,0 (6,5 \pm 1,8)	0,9-9,9 (4,4 \pm 2,5)	4,0-9,1 (6,4 \pm 1,7)	0,5-9,2 (4,3 \pm 2,7)
Secchi (m)	1,2-1,9 (1,5 \pm 0,3)	1,1-1,6 (1,2 \pm 0,2)	0,6-1,0 (0,8 \pm 0,2)	0,2-0,8 (0,5 \pm 0,2)	0,8-1,7 (1,1 \pm 0,3)	0,7-1,4 (1,0 \pm 0,2)
Clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,9-18,6 (10,0 \pm 7,0)	3,8-17,9 (11,7 \pm 4,5)	1,4-153,8 (20,2 \pm 36,8)	1,1-15,4 (5,5 \pm 4,0)	0,5-62,0 (18,7 \pm 15,8)	1,3-69,0 (14,8 \pm 13,2)

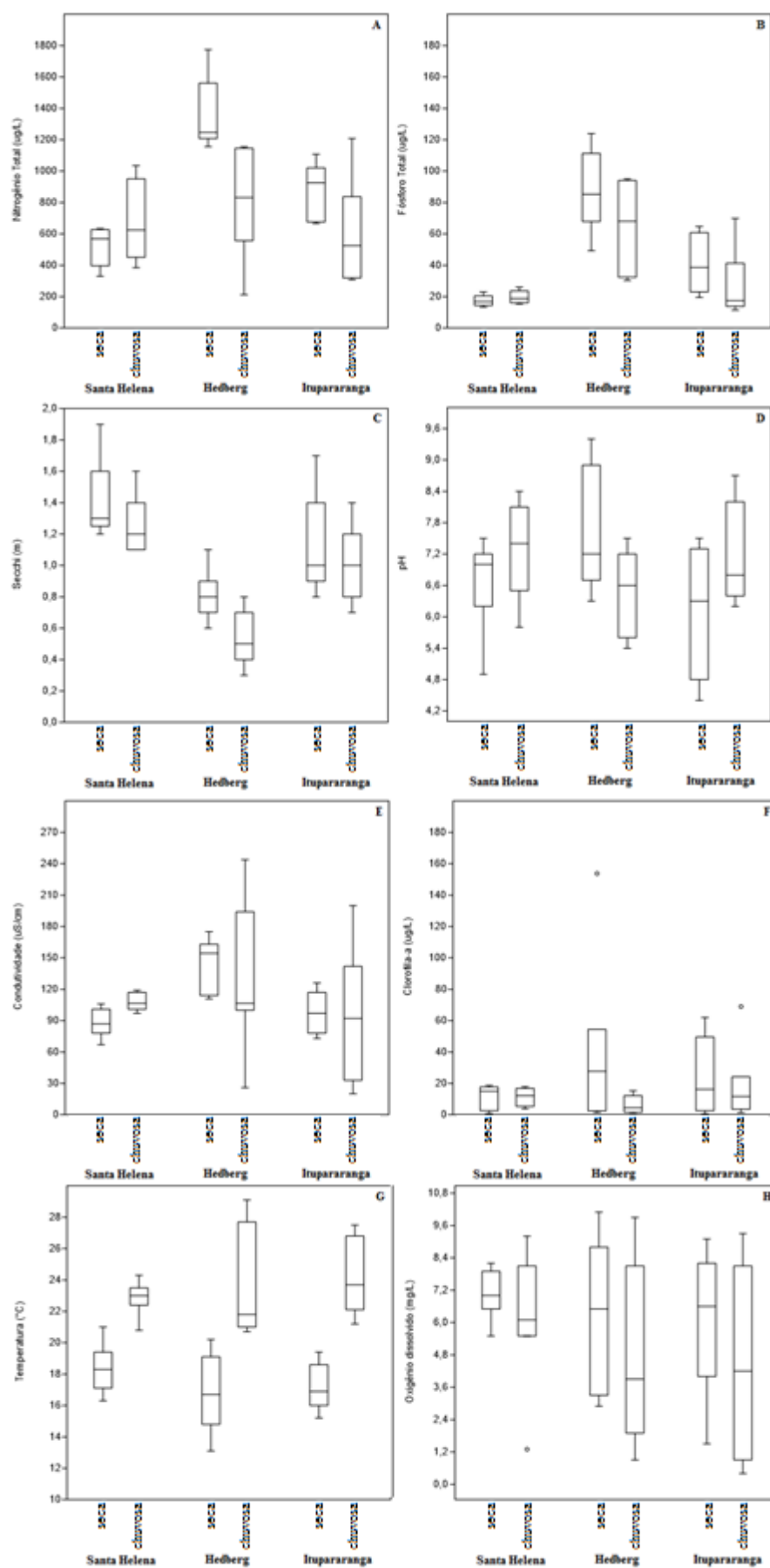


Figura 4. Box-Plot das variáveis abióticas, clorofila-a e profundidade do disco de Secchi nos três reservatórios durante as estações seca e chuvosa. Os círculos vazios (F e H) representam “outliers”.

Considerando as diferentes estações (seca e chuvosa), no reservatório de Santa Helena, foram observadas as menores concentrações de fósforo total (PT), nitrogênio total (NT) e clorofila-a, as quais estão próximas aos limites estabelecidos pela resolução CONAMA (357/2005) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e padrões de lançamento de efluentes e define valor máximo de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o fósforo total, $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a clorofila-a e valores entre $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $3700 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o nitrogênio total. No entanto, em Itupararanga, durante as duas estações, foram observadas concentrações de PT e clorofila-a acima dos valores estabelecidos pela resolução acima citada, o mesmo sendo observado para o PT no Hedberg, o qual apresentou as maiores concentrações deste nutriente dentre os reservatórios analisados (Fig. 4 e Tab. 3).

Os efeitos da variação da temperatura entre as diferentes camadas da coluna d'água possui uma enorme importância na dinâmica dos ecossistemas lênticos, devido ao fenômeno da estratificação térmica. Em reservatórios tropicais, diferenças de 1°C entre o epilânio e o hipolânio, são suficientes para promover a estratificação térmica da coluna d'água (Esteves 2011, Tundisi *et al.* 2008), alterando a densidade da água e promovendo a formação de barreiras físicas para diversos grupos de organismos, especialmente os microscópicos. No geral, os três reservatórios apresentaram perfil estratificado durante as amostragens (Fig. 5), no entanto, durante a estação seca (jul/15), os três reservatórios apresentaram perfil de mistura, o mesmo sendo observado para Santa Helena durante a estação chuvosa de 2015 (mar/15). A mistura da coluna d'água refletiu diretamente na composição de espécies nos diferentes compartimentos (coluna d'água e sedimento superficial), os quais apresentaram uma alta similaridade (76% - 81%) se comparado aos de perfil estratificado (54% - 62%).

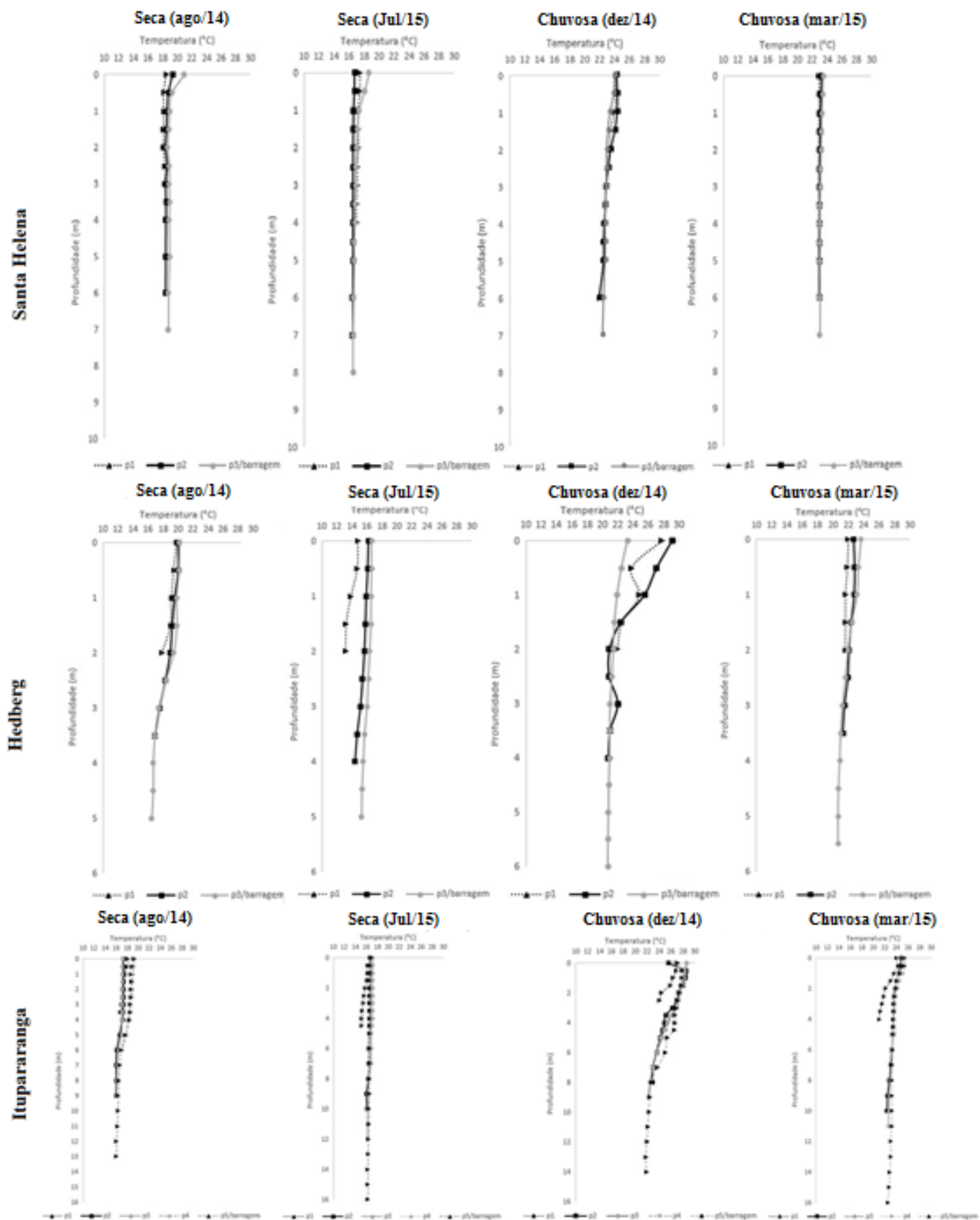


Figura 5. Variação do perfil térmico na coluna d'água nos três reservatórios durante as estações seca e chuvosa. O eixo x representa a temperatura (°C) e o eixo y a profundidade (m).

Sedimento superficial

No sedimento superficial foram mensurados o carbono orgânico total (COT%), nitrogênio total (NT%) e fósforo total (PT%), além do oxigênio dissolvido do fundo da coluna d'água. De acordo com Smol (2008), os dados do sedimento superficial (2 cm superficiais) representam geralmente de um a dois de informação acumulada. Por isso, os dados de COT (%), NT(%) e PT(%) foram extrapolados para as demais coletas, já que estes parâmetros foram estimados somente uma vez durante todo o estudo. As três variáveis apresentaram diferenças significativas entre os reservatórios (teste t, $p \leq 0,05$), sendo os maiores valores de COT(%) e NT (%) observadas em Itupararanga e de PT (%) em Hedberg. Já os menores valores de COT (%), NT (%) e PT (%) foram observados em Santa Helena (Fig. 6A-C).

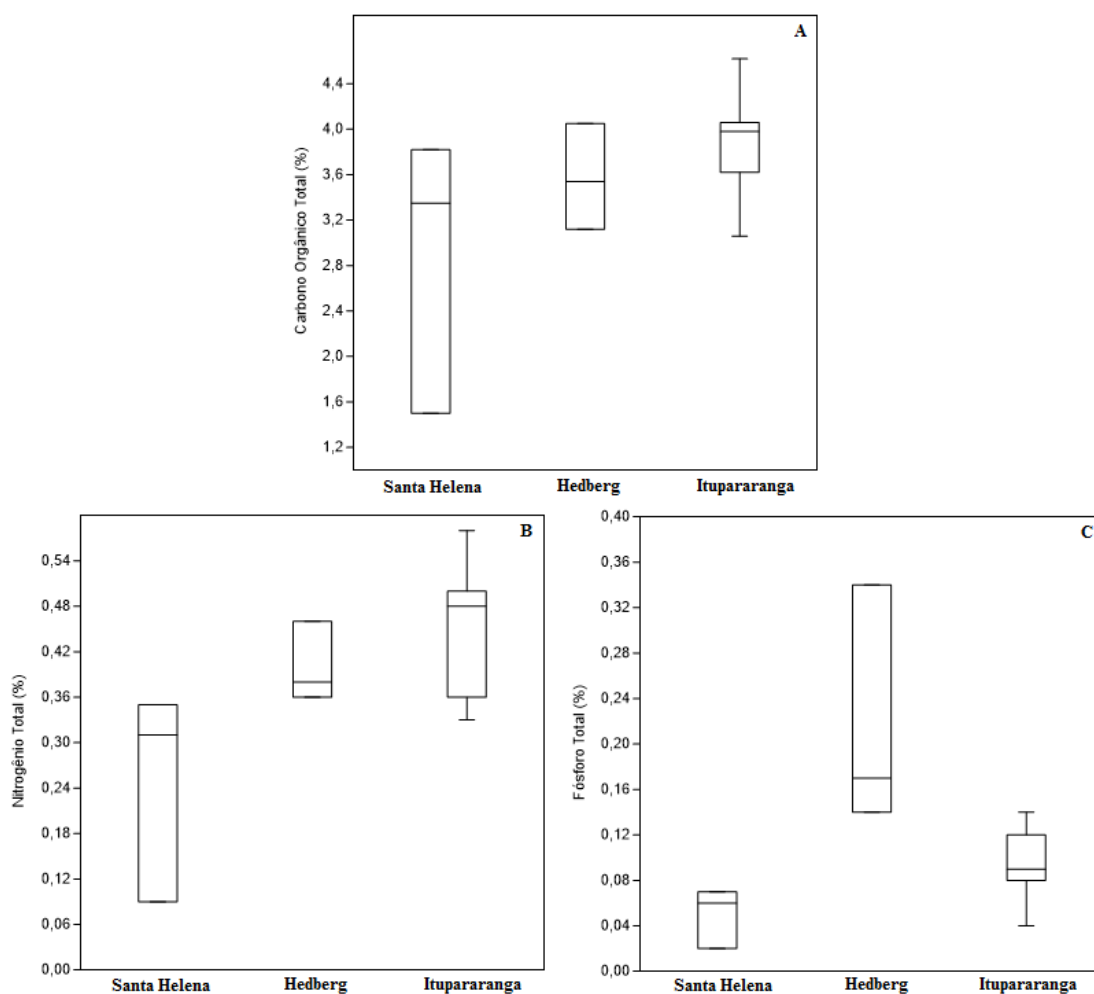


Figura 6. Box-Plot mostrando a variação do carbono orgânico total, fósforo total e nitrogênio total no sedimento superficial de cada reservatório estudado.

No geral, os reservatórios apresentaram uma ampla variação no oxigênio dissolvido no fundo da coluna d'água (Fig. 7), durante as estações seca e chuvosa, para as quais foram observadas diferenças significativas de acordo com o teste t ($p \leq 0,05$). As menores concentrações foram observadas em Hedberg e Itupararanga, durante a estação chuvosa, enquanto a maior foi em Santa Helena durante a mesma estação. No fundo da coluna d'água de todos os pontos de coleta em que o oxigênio apresentou concentrações menores que 1 mg/L, não foram observadas ocorrências de fungos zoospóricos ou oomicetos, independentemente do reservatório ou estação. Por outro lado, Santa Helena durante a estação chuvosa apresentou as maiores concentrações de OD no fundo da coluna d'água, onde foi observada uma alta abundância de organismos zoospóricos heterotróficos. Estes dados indicam uma limitação destes organismos a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, assim como mencionado por Sparrow (1968), Marano *et al.* 2011 e Wurbacher *et al.* (2010, 2016).

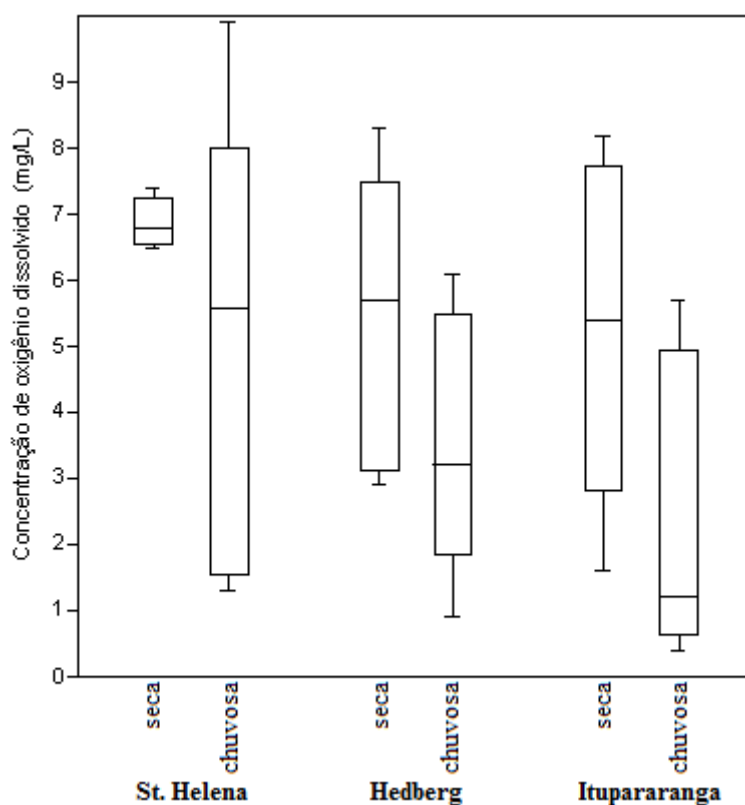


Figura 7. Variação na concentração de oxigênio dissolvido no fundo da coluna d'água, nos três reservatórios durante a estação seca e chuvosa.

Análises filogenéticas

No total, 102 sequências das regiões 18S, ITS, 28S, RPB1, RPB2 e COXI foram obtidas durante o estudo (Tabela 1, apêndice I), considerando os dois grupos de organismos, as quais representam 25 táxons. Por meio das análises de máxima verossimilhança, 33 espécimes foram identificados ou tiveram as identificações morfológicas corroboradas, dos quais nove são de fungos zoospóricos e 24 de oomicetos. Com relação aos últimos, *Plectospora gemmifera* Drechsler foi inserida pela primeira vez em análises filogenéticas (Jerônimo *et al.* 2017 - Anexo I - Phytotaxa 307: 191-198). Já dentre os fungos zoospóricos, *N. ramosa* Butler e a nova espécie de *Nowakowskiella* (*Nowakowskiella crenulata* – Capítulo 2) foram inseridas pela primeira vez em reconstruções filogenéticas, bem como *Rhizophydium angulosum* Karling, para o qual está sendo proposta uma nova combinação (Capítulo 3). As demais filogenias (utilizadas para confirmar ou identificar os isolados), assim como as imagens dos táxons identificados em nível de espécie, foram inseridas no material complementar I.

Diversidade

A maioria dos estudos desenvolvidos em ecossistemas lênticos utilizaram técnicas avançadas de sequenciamento de última geração, detectando assim grande parte da riqueza dos táxons, no entanto, com uma baixa resolução taxonômica (geralmente em nível de ordem), nos quais, os resultados estão diretamente relacionados à confiabilidade das sequências disponíveis nos bancos de dados gênicos. Durante este estudo utilizamos principalmente as características morfológicas para identificar os espécimes e as ferramentas moleculares foram empregadas, no geral, para corroborar as identificações morfológicas. Com isso, os dados obtidos apresentam uma maior especificidade taxonômica e uma discussão mais aprofundada (em nível de espécie ou gênero).

Durante o estudo, 52 táxons de organismos zoospóricos heterotróficos (fungos zoospóricos e oomicetos) foram identificados, sendo 25 deles representantes dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota (fungos zoospóricos) e 27 do filo Oomycota (Tab. 4). Dentre os fungos zoospóricos, 64 espécimes foram observados com 12 táxons identificados em nível específico, dentro os quais, uma nova espécie para o gênero *Nowakowskiella* J. Schröt foi descrita (*Nowakowskiella crenulata* Jerônimo & Pires-Zottarelli – ver capítulo 2) e o gênero *Avachytrium* Velez & Letcher relatado pela primeira vez para o Brasil. Os gêneros *Nowakowskiella* J. Schröt, *Rhizophydium* Schenk,

Diplophlyctis J. Schröt e *Cladochytrium* Nowak foram, respectivamente, os mais frequentes e abundantes dentre os fungos zoospóricos (Tab. 4).

As análises de Máxima Verossimilhança (Anexo I, capítulos 2 e 3) foram importantes para corroborar e/ou identificar nove isolados, dentre eles, *Avachytrium* sp., *Asterophlyctis sarcoptoides*, *Nowakowskiella ramosa*, *Nowakowskiella hemisphaerospora*, *Nowakowskiella crenulata*, *Nowakowskiella* sp.1, *Rhizophydium angulosum*, *Rhizophydium elyense* e *Siphonaria* sp.

Dentre os representantes do filo Oomycota, 84 espécimes foram observados e 13 táxons identificados em nível específico, sendo a espécie *Plectospira gemmifera* Drechsler, isolada em amostras de sedimento superficial de Itupararanga, relatada pela primeira vez para o Brasil (Anexo II - Jerônimo *et al.* 2017). *Pythium* Pringsheim, *Dictyuchus* Leitg. e *Aphanomyces* de Bary foram os gêneros mais frequentes e abundantes durante o estudo.

As análises de Máxima Verossimilhança foram importantes para corroborar e/ou identificar 24 isolados, dentre eles, *Achlya caroliniana*, *Achlya klebsiana*, *Achlya prolifera*, *Aphanomyces laevis*, *Dictyuchus monosporus*, *Dictyuchus pseudodictyon*, *Plectospira gemmifera*, *Pythium inflatum*, *Pythium midletonii*, *Pythium torulosum*, *Pythium* sp.1, *Pythium* sp.2, *Pythium* sp.3, *Pythium* sp.4, *Pythium* sp.5, *Pythium* sp.6, *Pythium* sp.7, *Phytopythium vexans*, *Saprolegnia aenigmatica* e *Saprolegnia subterranea* (Anexo III).

Os isolados pertencentes ao gênero *Pythium*, não identificados em nível de espécie, foram divididos em grupos com base no tipo de zoosporângio segundo Plaats-Niterink (1981), sendo o grupo dos filamentosos não inflados denominados de grupo P, os filamentosos inflados de grupo F e os esféricos de grupo T.

Tabela 4. Ocorrência, frequência e abundância dos organismos zoospóricos heterotróficos nos três reservatórios da Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê, durante as estações seca e chuvosa. Legendas: **FT**: Frequência total; **AT**: Abundância total. **Stsec**: Santa Helena estação seca; **Stchu**: Santa Helena estação chuvosa; **Hsec**: Hedberg estação seca; **Hchu**: Hedberg estação chuvosa; **Itsec**: Itupararanga estação seca; **Itchu**: Itupararanga estação chuvosa.

Fungos zoospóricos	Stsec	Stchu	Frequência (%)	Abundância	Hsec	Hchu	Frequência (%)	Abundância	Itsec	Itchu	Frequência (%)	Abundância	FT (%)	AT
<i>Avachytrium</i> sp.1	0	0	0	0	1	0	50	0,004	0	0	0	0	16,6	0,004
<i>Catenochytrium</i> sp.1	0	1	50	0,004	1	0	50	0,004	0	0	0	0	33,3	0,008
<i>Catenomyces</i> sp.1	0	0	0	0	1	0	50	0,004	0	0	0	0	16,6	0,004
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling	0	0	0	0	0	5	50	0,021	0	0	0	0	16,6	0,021
<i>Chytrium</i> <i>appendiculatus</i> Karling	1	0	50	0,004	0	0	0	0	0	1	50	0,003	33,3	0,007
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling	1	0	50	0,004	1	2	100	0,013	1	0	50	0,003	66,6	0,019
<i>Cladochytrium setigerum</i> Karling	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,003	16,6	0,003
<i>Cylindrochytridium</i> sp.1	0	2	50	0,008	0	0	0	0	0	0	0	0	16,6	0,008
<i>Diplophlyctis intestina</i> (Schenk) J. Schröt	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,003	16,6	0,003
<i>Diplophlyctis sarcopoides</i> (H.E. Petersen) Dogma	3	0	50	0,013	0	1	50	0,004	1	0	50	0,003	50	0,019
<i>Endochytrium</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,003	16,6	0,003
<i>Entophlyctis</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,003	16,6	0,003
<i>Karlingiomyces</i> spp.	0	0	0	0	1	0	50	0,004	1	1	100	0,005	50	0,009
<i>Nowakowskiella crenulata</i> Jerônimo & Pires-Zottarelli	0	2	50	0,008	1	2	100	0,013	0	0	0	0	50	0,021
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i> Shanor	2	2	100	0,017	1	1	100	0,008	0	1	50	0,003	83,3	0,028
<i>Nowakowskiella ramosa</i> E.J. Butler	1	2	100	0,013	0	0	0	0	0	1	50	0,003	50	0,015
<i>Nowakowskiella</i> sp. 1	0	2	50	0,008	0	0	0	0	0	0	0	0	16,6	0,008
<i>Nowakowskiella</i> spp.	0	1	50	0,004	0	1	50	0,004	2	1	100	0,008	66,6	0,016
<i>Phlyctochytrium</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,003	16,6	0,003
<i>Rhizophydium angulosum</i> Karling	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,003	16,6	0,003
<i>Rhizophydium elyense</i> Sparrow	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	100	0,005	33,3	0,005
<i>Rhizophydium</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	50	0,003	16,6	0,003

[illegible]

Fungos zoospóricos	Stsec	Stchu	Frequência (%)	Abundância	Hsec	Hchu	Frequência (%)	Abundância	Itsec	Itchu	Frequência (%)	Abundância	FT (%)	AT
<i>Pythium</i> sp. 7	1	0	50	0,003	0	0	0	0	0	0	0	0	16,6	0,003
<i>Pythium</i> spp. F	2	0	50	0,007	2	5	100	0,024	0	0	0	0	50	0,031
<i>Pythium</i> spp. P	0	4	50	0,014	2	3	100	0,017	0	3	50	0,006	66,6	0,038
<i>Pythium</i> spp. T	3	4	100	0,024	0	1	50	0,003	1	0	50	0,002	66,6	0,03
<i>Saprolegnia aenigmatica</i> Sand.-Sierra & Diég. Urib.	0	0	0	0	0	1	50	0,003	0	0	0	0	16,6	0,003
<i>Saprolegnia subterranea</i> Dissmann	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	50	0,002	16,6	0,002
Riqueza de espécies	10	9			6	13			5	6				

Dentre os fungos zoospóricos, *Diplophlyctis sarcoptoides* (H.E. Petersen) Dogma, *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor e *Cladochytrium replicatum* Karling foram comuns aos três reservatórios, durante o período de estudo. Por outro lado, *Cylindrochytridium* sp.1 e *Nowakowskiella* sp.1 ocorrem exclusivamente em Santa Helena, *Avachytrium* sp.1, *Catenomyces* sp., *Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling e *Cladochytrium setigerum* Karling em Hedberg, enquanto *Diplophlyctis intestina* (Schenk) J. Schröt, *Endochytrium* sp.1, *Entophlyctis* sp.1, *Phlyctochytrium* sp.1, *Rhizophydium angulosum* Karling e *R. elyense* Sparrow o foram em Itupararanga (Fig. 8A). Já com relação aos representantes do filo Oomycota, *Achlya* spp. *Aphanomyces* spp., *Dictyuchus* spp., *Pythium* spp. grupo T (zoosporângio esférico) e *Pythium* spp. grupo P (zoosporângio filamentosos não inflado) ocorrem nos três reservatórios durante o período de estudo. No entanto, *Achlya caroliniana* Coker, *Achlya prolifera* Ness, *Pythium middletonii* Sparrow, *Pythium* sp.1, *Pythium* sp.2, *Pythium* sp.5, *Pythium* sp.6 e *Pythium* sp.7, ocorreram exclusivamente em Santa Helena, *Achlya klebsiana* Pieters, *Aphanomyces laevis* de Bary, *Pythium* sp.4, *Phytopythium vexans* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Levesque, *Saprolegnia aenigmatica* Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo, *Pythiogeton* sp.1 e *Pythium inflatum* V.D. Matthews em Hedberg, enquanto *Dictyuchus monosporus* Leitg., *D. pseudodictyon* Coker & Braxton, *Pythium torulosum* Coker & P. Patt., *Saprolegnia subterranea* (Disssmann) Seym. e *Plectospora gemmifera* Drechsler o foram em Itupararanga (Fig. 8B).

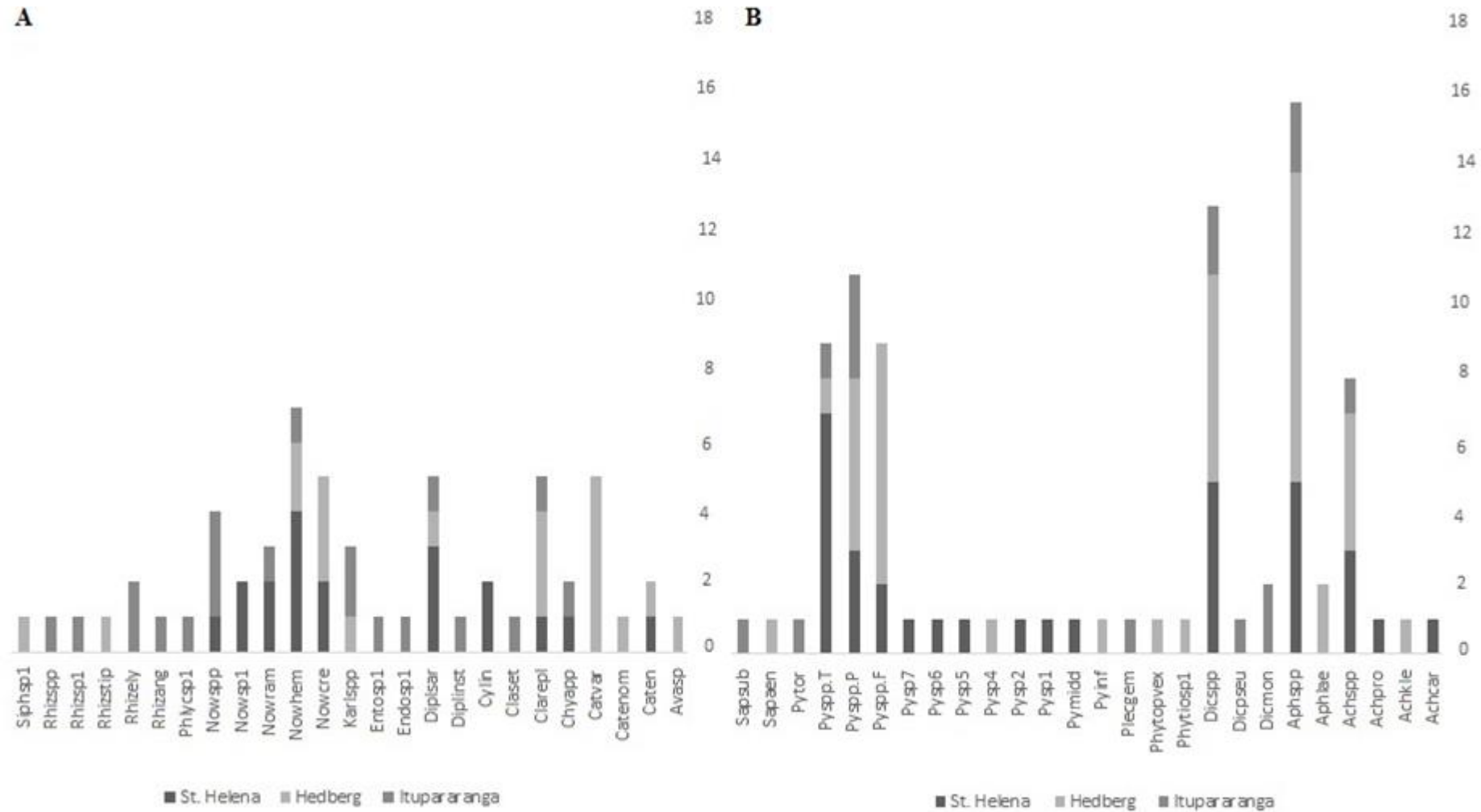


Figura 8. Número de ocorrência de fungos zoospóricos (A) e oomicetos (B) nos reservatórios analisados durante o estudo. Legendas (A): **Siphsp1**: *Siphonaria* sp.1; **Rhizspp**: *Rhizophydium* spp.; **Rhizsp1**: *Rhizophydium* sp.1; **Rhizstip**: *Rhizophydium* stiptatum; **Rhizely**: *Rhizophydium* elyense; **Rhizang**: *Rhizophydium* angulosum; **Phlycsp1**: *Phlyctochytrium* sp.1; **Nowssp**: *Nowakowskiella* spp.; **Nowsp1**: *Nowakowskiella* sp.1; **Nowram**: *Nowakowskiella* ramosa; **Nowhem**: *Nowakowskiella* hemisphaerospora; **Nowcre**: *Nowakowskiella* crenulata; continua ...

Karlsp: *Karlingiomyces* spp; **Entosp1**: *Entophlyctis* sp.1; **Endosp1**: *Endochytrium* sp.1. **Diplsar**: *Diplophlyctis sarcoptoides*; **Diplinst**: *Diplophlyctis intestina*; **Cylin**: *Cylindrochytrium* sp.1; **Cladset**: *Cladochytrium setigerum*; **Clarepl**: *Cladochytrium replicatum*; **Chyapp**: *Chytrium appendiculatus*; **Catvar**: *Catenophlyctis variabilis*; **Catenom**: *Catenomyces* sp.1; **Caten**: *Catenochytridium* sp.1; **Avasp**: *Avachytrium* sp.1. Legendas (B): **Sapsub**: *Saprolegnia subterranea*; **Sapaen**: *Saprolegnia aenigmatica*; **Pytor**: *Pythium torulosum*; **Pyspp.T**: *Pythium* group T; **Pyspp.P**: *Pythium* group P; **Pyspp.F**: *Pythium* group F; **Pysp7**: *Pythium* sp.7; **Pysp6**: *Pythium* sp.6; **Pysp5**: *Pythium* sp.5; **Pysp4**: *Pythium* sp.4; **Pysp2**: *Pythium* sp.2; **Pysp1**: *Pythium* sp.1; **Pymidd**: *Pythium middletonii*; **Pyinf**: *Pythium inflatum*; **Plegem**: *Plectospora gemmifera*; **Phytovex**: *Phytopythium vexans*; **Pytiosp1**: *Pythiogeton* sp.1; **Dicspp**: *Dictyuchus* spp; **Dicpseu**: *Dictyuchus pseudodyction*; **Dicmon**: *Dictyuchus monosporus*; **Aphspp**: *Aphanomyces* spp. **Aphlae**: *Aphanomyces laevis*; **Achspp**: *Achlya* spp; **Achpro**: *Achlya prolifera*; **Achkle**: *Achlya klebsiana*; **Achcar**: *Achlya caroliniana*

De forma geral foi observada uma maior riqueza de espécies na estação chuvosa, embora não tenham sido observadas diferenças significativas, de acordo com teste t ($p \leq 0,05$), o que pode ser reflexo da baixa pluviosidade durante o período amostrado, já que Pires-Zottarelli (1990) e Rocha (2004) encontraram maior diversidade durante a estação chuvosa em lagos e reservatórios do estado de São Paulo. Ainda assim, os reservatórios de Santa Helena e Hedberg apresentaram uma maior riqueza de espécies de organismos zoospóricos heterotróficos durante a estação chuvosa, enquanto Itupararanga o foi na estação seca. Já dentre os oomicetos, a maior riqueza foi observada durante a estação chuvosa em Hedberg, enquanto os fungos zoospóricos, o foram durante a estação seca em Itupararanga (Fig. 9).

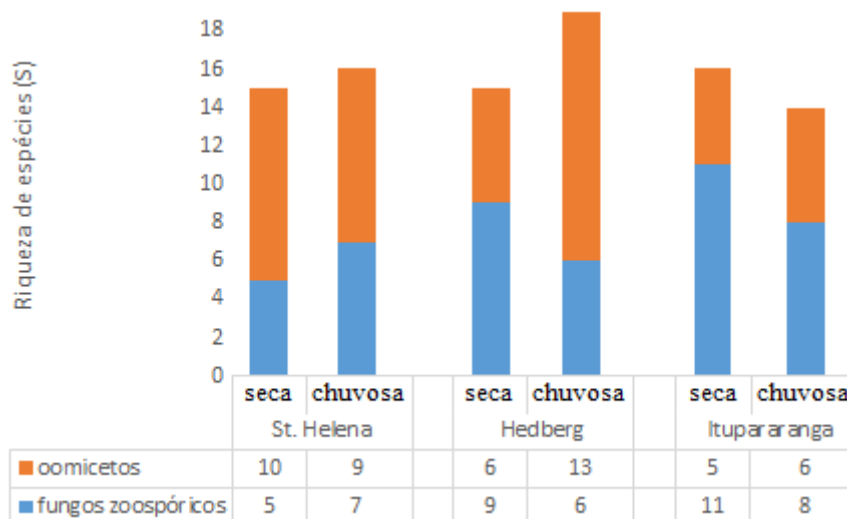


Figura 9. Riqueza de espécies de fungos zoospóricos e oomicetos nos três reservatórios, durante as estações seca e chuvosa, no período de estudo.

Considerando os diferentes compartimentos (coluna d'água e sedimento), os oomicetos apresentaram maior riqueza de espécies na coluna de água (Fig. 10A), enquanto os fungos zoospóricos o foram no sedimento superficial (Fig. 10B). No entanto, na coluna d'água de Itupararanga, os fungos zoospóricos apresentaram maior riqueza de espécies na estação chuvosa, enquanto nas amostras de sedimento de Hedberg, os oomicetos apresentaram maior riqueza de espécies durante a estação seca. Além disso, os oomicetos foram mais frequentes e abundantes na coluna d'água, enquanto os fungos zoospóricos o foram no sedimento superficial.

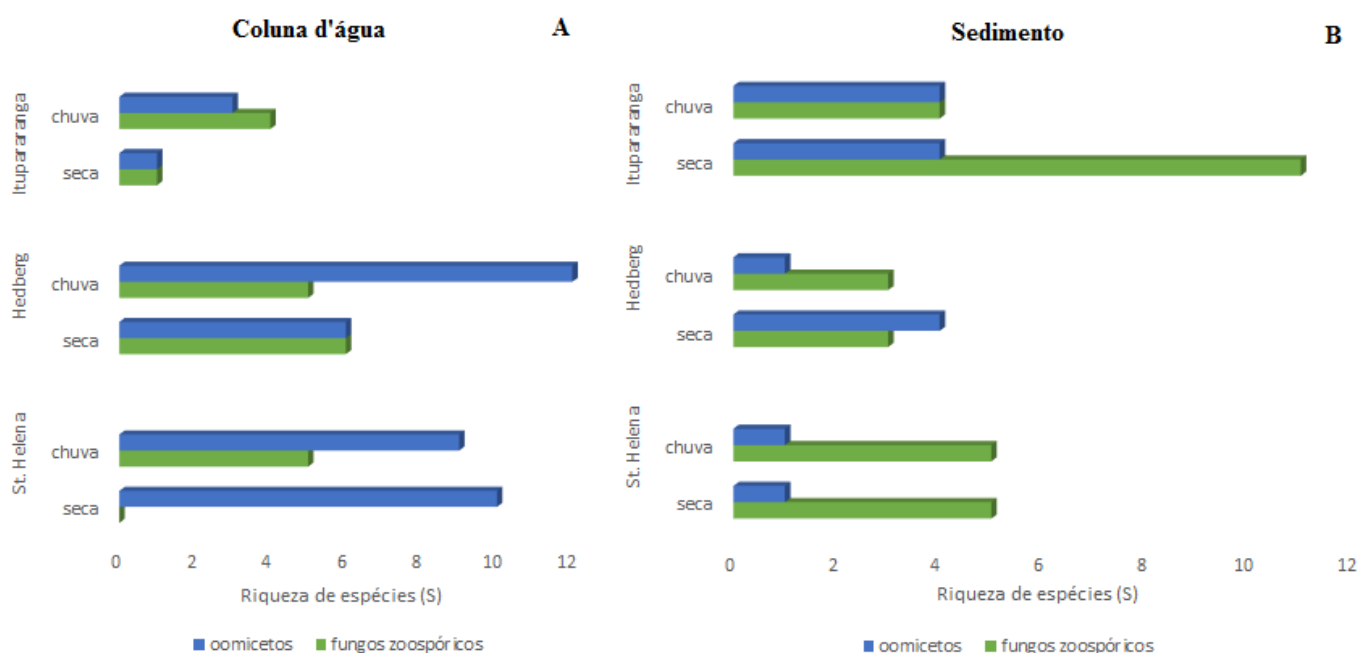


Figura 10. Riqueza de espécies de fungos zoospóricos e oomicetos na coluna d'água (A) e sedimento superficial (B) nos três reservatórios, durante as estações seca e chuvosa, no período de estudo.

Durante o estudo, foi observada uma comunidade diversa com poucos táxons dominantes (Tab. 5), sendo *Cladochytrium replicatum*, *Nowakowskiella hemisphaerospora*, *Aphanomyces* spp., *Dictyuchus* spp., *Pythium* grupo P e *Pythium* grupo T, os táxons mais frequentes e abundantes, considerando os reservatórios e estações (seca e chuvosa). Wurzbacher *et al.* (2016) observaram a predominância de representantes da ordem Cladochytriales (*Nowakowskiella* e *Cladochytrium*) em ecossistemas lênticos de regiões temperadas, enquanto no Brasil, Rocha (2004) mencionou a expressiva frequência dos representantes dos gêneros *Nowakowskiella*, *Dictyuchus* e *Pythium* spp. do grupo T, em lagos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP.

Tabela 5. Índices de diversidade dos organismos zoospóricos heterotróficos nos reservatórios durante as estações seca e chuvosa. Letras iguais indicam que os valores não apresentaram diferenças significativas entre as estações.

Índices	Hedberg		St. Helena		Itupararanga	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
Riqueza de espécies (S)	15a	19a	15a	16a	16a	14a
Dominância de Simpson (D)	0,91a	0,90a	0,92a	0,92a	0,93a	0,92a
Índice de Shannon (H')	2,60 a	2,60a	2,60a	2,60a	2,70a	2,60a
Equitatividade (E)	0,89a	0,75a	0,89a	0,87a	0,97a	0,94a

Uma similar composição de espécies foi observada entre as estações (SI = 88%), nas quais, *Chytrium appendiculatus*, *Cladochytrium replicatum*, *Diplophlyctis sarcopoides*, *Nowakowskiella crenulata*, *N. hemisphaerospora*, *N. ramosa*, *R. elyense*, *Pythium* spp. grupo P, *Pythium* spp. grupo T e *Pythium* spp. grupo F foram observados tanto na estação seca como na chuvosa. Por outro lado, *Catenophlyctis variabilis*, *Cylindrochytridium* sp.1, *Nowakowskiella* sp.1, *Achlya klebsiana*, *A. prolifera*, *Aphanomyces laevis*, *Dictyuchus monosporus*, *D. pseudodictyon*, *Phytophythium vexans*, *Pythium inflatum*, *P. torulosum* e *Saprolegnia aenigmatica* foram restritos à estação chuvosa, a qual apresentou maiores concentrações de nitrogênio total e fósforo total (exceto por Hedberg), enquanto *Cladochytrium setigerum*, *Diplophlyctis intestina*, *Rhizophyidium angulosum*, *R. stiptatum*, *Siphonaria* sp.1, *Achlya caroliniana*, *Plectospira gemmifera*, *Pythium middletonii* e *Saprolegnia subterranea*, o foram na estação seca, associada à menores concentrações destes nutrientes (exceto por Hedberg). A alta similaridade entre as estações pode ser reflexo da baixa pluviosidade observada durante o período de estudo, especialmente na estação chuvosa, a qual apresentou volumes muito abaixo das médias históricas para os meses amostrados, já que diversos estudos (Czeczuga 1986, Pires-Zottarelli 1990, Czeczuga 1995, Rocha 2004, Marano *et al.* 2008, Czeczuga *et al.* 2010, Marano *et al.* 2011) apontaram maior diversidade nos períodos de maior pluviosidade.

Foi observada uma comunidade diversa, com poucos táxons dominantes entre os compartimentos, os quais ocorreram de maneira geral na coluna d'água e sedimento superficial (SI = 81%). No entanto, *R. stiptatum*, *A. caroliniana*, *A. klebsiana*, *A. prolifera*, *A. laevis*, *D. monosporus*, *P. vexans*, *P. middletonii*, *Pythium* spp. grupo F, *S. aenigmatica* ocorreram exclusivamente na coluna d'água, enquanto *Chytrium appendiculatus*, *C. setigerum*, *D. intestina*, *N. hemisphaerospora*, *R. angulosum*, *R. elyense*, *Siphonaria* sp.1, *D. pseudodictyon*, *P. gemmifera*, *P. inflatum*, *P. torulosum* e *S. subterranea* o foram no sedimento superficial. Sparrow (1968), Czeczuga & Muszynska (2001), Amal *et al.* (2005) e Zappia *et al.* (2014) também relataram a expressiva frequência dos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus* e *Pythium* em estudos de distribuição no perfil da coluna d'água de ecossistemas lênticos. De acordo com estes autores, *Pythium* spp. foram especialmente frequentes, assim como observado neste estudo. No Brasil, Rocha & Pires-Zottarelli (2002) mencionaram, para o perfil da coluna d'água do reservatório do Guarapiranga, os mesmos gêneros citados anteriormente,

embora *Pythium* não tenha se destacado como um dos mais frequentes. Já com relação ao sedimento, Yang & Hong (2015) mencionaram a expressiva frequência de *Pythium* e *Phytophythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, estando estes gêneros restritos às camadas superficiais do perfil sedimentar, enquanto Wurzbacher *et al.* (2016) demonstraram que Rhizophydiales e Cladochytriales apresentaram expressiva frequência de ocorrência neste compartimento.

Considerando os gradientes trófico e sazonal observados na PCA (Fig. 2), estes parâmetros foram relacionados à ocorrência e distribuição dos organismos zoospóricos heterotróficos. A análise de coordenadas principais (PCoA) dos dados bióticos da coluna d'água (Fig. 11) explicou 51,3% da variabilidade total dos dados, sendo o eixo 1 o que explicou maior parte desta variação (31,8%). A PCoA indicou que os espécimes de *Dictyuchus* estão relacionados com Santa Helena durante a estação chuvosa, enquanto os espécimes de *Achlya* estão relacionados ao mesmo reservatório na estação seca, nas quais, as mais baixas concentrações de fósforo total e nitrogênio total foram observadas. Por outro lado, os espécimes de *Aphanomyces*, *Pythium* com zoosporângios filamentosos não inflados (grupo P), estão relacionados com Hedberg na estação chuvosa, o qual apresentou altas concentrações de PT e NT. Rocha (2004) também observou a relação dos espécimes de *Pythium* do grupo P com as altas concentrações de NT e PT no lago das Garças do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP.

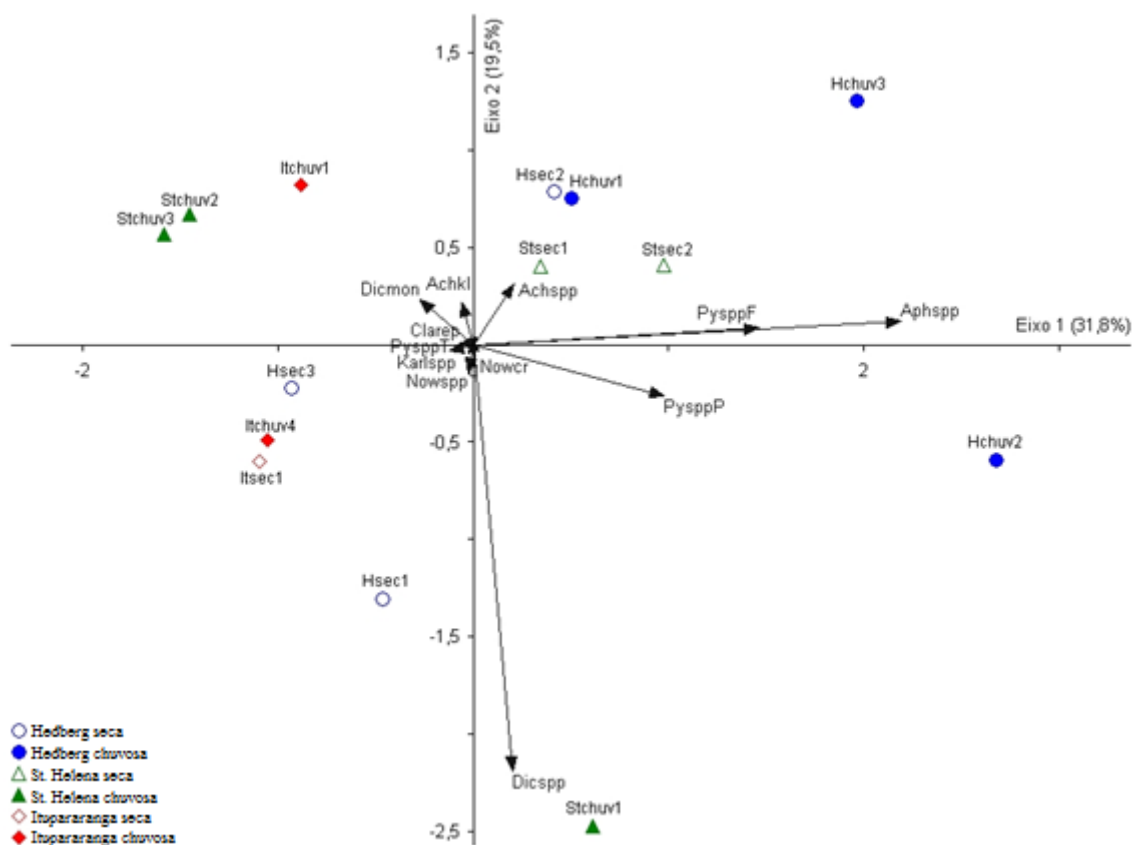


Figura 11. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos dados bióticos da coluna d'água, durante as estações seca e chuvosa. Os táxons com somente uma ocorrência ao longo do estudo não foram incluídos na análise. Legendas: **Achkl**: *Achlya klebsiana*; **Achspp**: *Achlya* spp.; **Aphspp**: *Aphanomyces* spp.; **Clarep**: *Cladochytrium replicatum*; **Dicmon**: *Dictyuchus monosporus*; **Dicspp**: *Dictyuchus* spp.; **Karlsp**: *Karlingiomyces* spp.; **Nowcre**: *Nowakowskiella crenulata*; **Newspp**: *Nowakowskiella* spp.; **PysppF**: *Pythium* spp. grupo F; **PysppP**: *Pythium* spp. grupo P; **PysppT**: *Pythium* spp. grupo T; **Stsec1**: Santa Helena seca ponto 1; **Stsec2**: Santa Helena seca ponto 2; **Stsec3**: Santa Helena seca ponto 3; **Stchu1**: Santa Helena chuvosa ponto 1; **Stchu2**: Santa Helena chuvosa ponto 2; **Stchu3**: Santa Helena chuvosa ponto 3; **Hsec1**: Hedberg seca ponto 1; **Hsec2**: Hedberg seca ponto 2; **Hsec3**: Hedberg seca ponto 3; **Hchu1**: Hedberg chuvosa ponto 1; **Hchu2**: Hedberg chuvosa ponto 2; **Hchu3**: Hedberg chuvosa ponto 3; **Itsec1**: Itapararanga seca ponto 1; **Itsec2**: Itapararanga seca ponto 2; **Itsec3**: Itapararanga seca ponto 3; **Itsec4**: Itapararanga seca ponto 4; **Itsec5**: Itapararanga seca ponto 5; **Itchu1**: Itapararanga chuvosa ponto 1; **Itchu2**: Itapararanga chuvosa ponto 2; **Itchu3**: Itapararanga chuvosa ponto 3; **Itchu4**: Itapararanga chuvosa ponto 4; **Itchu5**: Itapararanga chuvosa ponto 5.

A PCoA dos dados bióticos do sedimento superficial (Fig. 12) explicou 46,3% da variabilidade total dos dados, com o eixo 1 explicando maior parte desta variação (27,5%). A PCoA mostrou que *Diplophlyctis sarcoptoides*, *Cladochytrium replicatum* e os espécimes de *Pythium* com zoosporângios esféricos (grupo T) estão relacionados com Santa Helena durante a estação seca, a qual apresentou baixas concentrações de PT e NT, enquanto *Catenophlyctis variabilis* está relacionado com Hedberg durante a estação chuvosa, onde foi observado altas concentrações de PT, NT e carbono orgânico total. Rocha (2004) também relacionou as ocorrências de *D. sarcoptoides* aos locais com baixas

concentrações de PT e NT no Lago das Ninféias (São Paulo, SP) e de *C. variabilis* aos locais de alta concentração destes nutrientes no Lago das Garças, embora estes relatos estejam relacionados a distribuição ao longo da coluna d'água, uma vez que este é o primeiro estudo a investigar a ocorrência destes organismos em sedimentos de ecossistemas lênticos brasileiros.

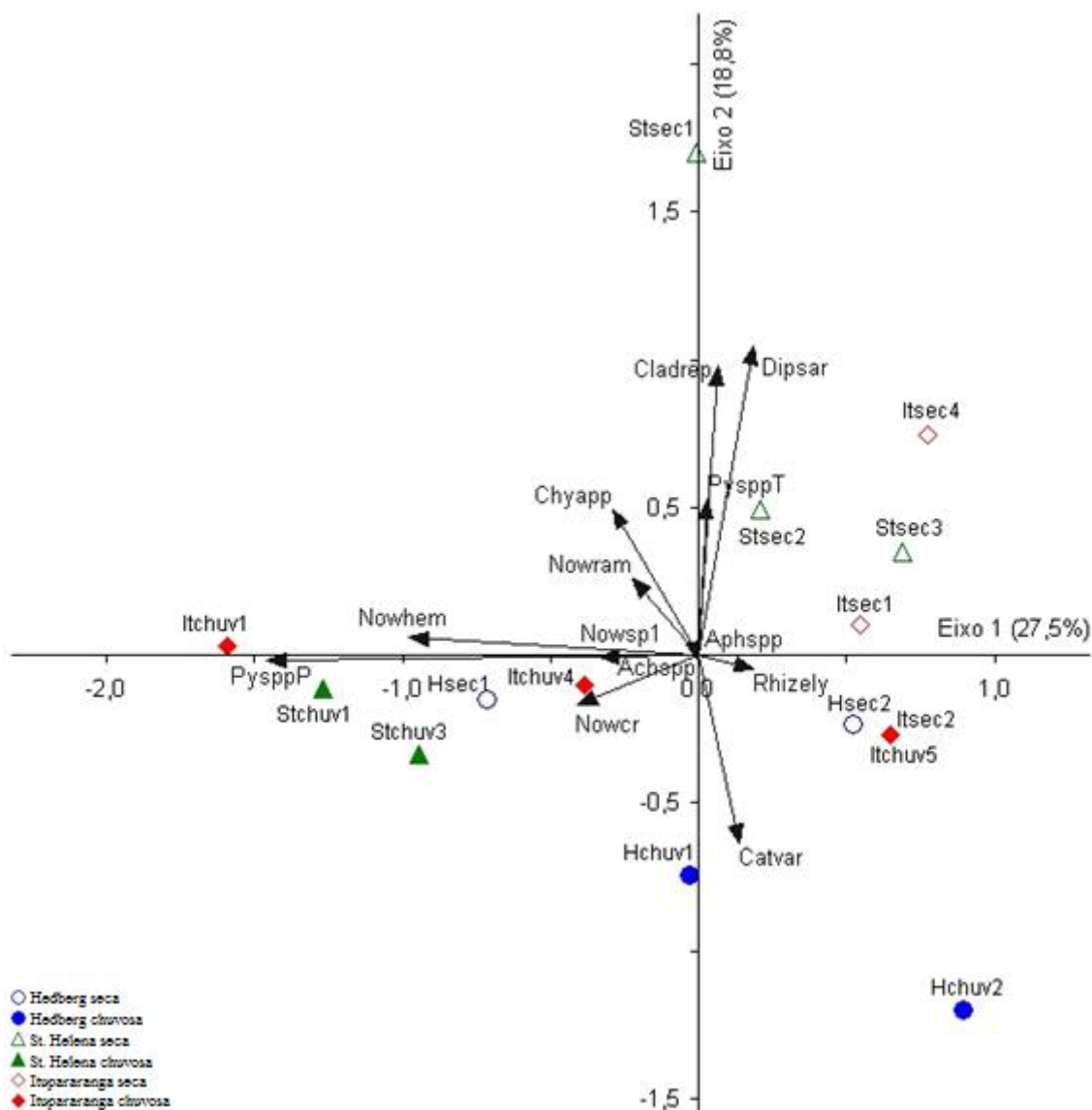


Figura 12. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos dados bióticos do sedimento superficial, durante as estações seca e chuvosa. Os táxons com somente uma ocorrência ao longo do estudo não foram incluídos na análise. Legendas: **Achspp**: *Achlya* spp.; **Aphspp**: *Aphanomyces* spp.; **Catvar**: *Catenophlyctis variabilis*; **Chyapp**: *Chytrium appendiculatus*; **Clarep**: *Cladochytrium replicatum*; **Dipsar**: *Diplophlyctis sarcoptoides*; **Nowcre**: *Nowakowskiella crenulata*; **Nowhem**: *Nowakowskiella hemisphaerospora*; **Nowram**: *Nowakowskiella ramosa*; **Nowsp1**: *Nowakowskiella* sp.1; **PysppP**: *Pythium* spp. grupo P; **PysppT**: *Pythium* spp. grupo T; **Rhizely**: *Rhizophydium elyense*; **Stsec1**: Santa Helena seca ponto 1; **Stsec2**: Santa Helena seca ponto 2; **Stsec3**: Santa Helena seca ponto 3; **Stchu1**: Santa Helena chuvosa ponto 1; **Stchu2**: Santa Helena chuvosa ponto 2; **Stchu3**: Santa Helena chuvosa ponto 3; **Hsec1**: Hedberg seca ponto 1; **Hsec2**: Hedberg seca ponto 2; **Hsec3**: Hedberg

seca ponto 3; **Hchu1**: Hedberg chuvosa ponto 1; **Hchu2**: Hedberg chuvosa ponto 2; **Hchu3**: Hedberg chuvosa ponto 3; **Itsec1**: Itupararanga seca ponto 1; **Itsec2**: Itupararanga seca ponto 2; **Itsec3**: Itupararanga seca ponto 3; **Itsec4**: Itupararanga seca ponto 4; **Itsec5**: Itupararanga seca ponto 5; **Itchu1**: Itupararanga chuvosa ponto 1; **Itchu2**: Itupararanga chuvosa ponto 2; **Itchu3**: Itupararanga chuvosa ponto 3; **Itchu4**: Itupararanga chuvosa ponto 4; **Itchu5**: Itupararanga chuvosa ponto 5.

Já que durante as amostragens foi observada maior frequência, abundância e riqueza de táxons de fungos zoospóricos no sedimento superficial e dos oomicetos na coluna d'água, podemos rejeitar a hipótese de que estes dois grupos ocorreriam preferencialmente na coluna d'água. Os poucos relatos de fungos zoospóricos em amostras de sedimento podem estar mais relacionadas a limitações de amostragens do que necessariamente aos padrões ecológicos destes fungos. Além disso, como não foram observadas diferenças significativas na riqueza de espécies entre as estações, não confirmamos a hipótese de que em épocas mais chuvosas apresentariam uma maior riqueza de organismos zoospóricos heterotróficos, comparado à estação seca, muito provavelmente reflexo da baixa pluviosidade observada, principalmente, durante a estação chuvosa.

Os organismos zoospóricos, apresentaram uma ampla distribuição ao longo de diferentes gradientes tróficos, assim como mencionado por Rocha (2004), estando algumas espécies relacionadas aos locais com as mais altas concentrações de nitrogênio e fósforo total, como *Catenophlyctis variabilis*, enquanto outras estão à locais com as mais baixas concentrações destes nutrientes (*Diplophlyctis sarcoptoides* e *Cladochytrium replicatum*) e que poderiam potencialmente ser táxons indicativos da qualidade das águas. Concluímos, portanto, que os organismos zoospóricos heterotróficos são, no geral, tolerantes às amplas variações nas concentrações de nitrogênio e fósforo, mas alguns táxons são limitados pela disponibilidade destes nutrientes, particularmente o fósforo.

Referências bibliográficas

- Amal, E. A., Aïcha, E. A. & Bernard, P.** 2005. *Achlya abortispora*, a new Oomycete isolated from water samples taken from a water reservoir in Morocco. *Current Microbiology* 53: 60-67.
- Amaral, A.M., Barbério, A., Voltolini, J.C. & Barros, L.** 2007. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste Allium (*Allium cepa*). *Revista Brasileira de Toxicologia* 20: 65-72.
- Birks, H.H. & Birks, H.J.** 2006. Multi-proxy studies in palaeolimnology. *Vegetation History Archaeobotany* 15: 235-251.
- Carlson, R.E.** 1977. A trophic state index for lakes. *Limnology and Oceanography*, 22: 361-369.
- CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura** (2018). Disponível online em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>. Acessado em 06 Junho de 2018.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2013. Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo. Parte 1. São Paulo, 301 p.
- Chen, M., Chen, F., Yu, Y., et al.** 2008. Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China. *Microbiology Ecology* 56: 572–583
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente.** 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. p. 23.
- Colins, C. & Willoughby, L.G.** 1962. The distribution of bacteria and fungal spores in Blelham Tarn with particular reference to an experimental overturn. *Archiv für Mikrobiologie* 43: 294-307.
- Cooke, W.B.** 1976. Fungi in sewage. In: Gareth Jones, E.B (Ed.). recent advances in Aquatic Mycology. London: Elek Science p. 389-434.
- Czczuga, B. Woronowicz, L., Brzozowska, K. & Chomutowska, H.** 1989. Studies of aquatic fungi IX. Mycoflora of different types springs. *Acta Hydrobiologica* 31: 273-283.
- Czczuga, B. Woronowicz, L., Brzozowska, K.** 1990a. Studies of aquatic fungi XII. Aquatic fungi of the lowland river Biebrza. *Acta Hydrobiologica* 26: 77-83.

- Czeczuga, B. Woronowicz, L., Brzozowska, K.** 1990b. Studies of aquatic fungi XIII. Mycoflora of river Czarna Hancza and its tributary, the river Marycha. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 75: 245-255.
- Czeczuga, B.** 1991a. Studies of aquatic fungi. Part XVI. Aquatic fungi of the river Pisa and its tributary, the river Skroda. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 19: 57-65.
- Czeczuga, B.** 1991b. Studies of aquatic fungi. Part XXII. Mycoflora of the river Wegorapa and its tributary, the river Goldapa-Jarka. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 19: 517-528.
- Czeczuga, B. & Woronowicz, L.** 1991. The lake Mamry complex. *Acta Mycologica* 27: 93-103.
- Czeczuga, B.** 1994. Studies of aquatic fungi. Part XVII. Aquatic fungi of Lake Hancza in the Suwalki Scenic Park and some adjacents lakes (northeastern Poland). *Acta Hydrobiologica* 36: 371-385.
- Czeczuga, B. & Muszynska, E.** 2001. Zoosporic fungi growing on Gymnosperm pollen in water of variety trophic state. *Polish Journal of Environmental Studies* 10: 89-94.
- Dawson, S.C. & Pace, N.R.** 2002. Novel Kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environents. *Proceedings Natural Academic Sciences of USA* 99: 8324-8329.
- Esteves, F.A.** 2011. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro. Interciencia. 3 ed. 826p.
- FLONA – Floresta Nacional de Ipanema, Plano de Manejo.** 2016. Instituto Chico Mendes de Preservação da Biodiversidade.
- Gerphagnon, M., Latour, D., Colombet, J. & Sime-Ngando, T.** 2013. A double staining method using SYTOX green and calcofluor white for studing fungal parasites of phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* dx.doi.org/10.1128/AEM.00696-13.
- Gleason, F. H., Karpov, S.A., Lilje, O., Macarthur, D.J. et al.** 2014. In: Gareth Jones, E. B., Hyde, K. D. e Pang, K. (Eds.). *Zoosporic parasites of phytoplankton*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp.279-304.
- Golterman, H.L. & Clymo, R.S.** 1969. *Methods for chemical analysis of freshwaters*. Oxford and Edinburg: Blackwell Scientific Publications. International Biological Programme. 171p.
- Grossart, H.P. & Rojas-Jimenez, K.** 2016. Aquatic fungi: targeting a forgotten in microbial ecology. *Current opinion in Microbiology* 31: 140-145.

- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Rocha, S.C.O. Gonçalves, D.R. et al.** 2017. New insights into *Plectospira* genus (Oomycetes, Straminipila): morphological and molecular analysis. *Phytotaxa* 307: 191-198.
- 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.
- Kagami, M., Bruin, A., Ibelings, B.A. & Donk, E.V.** 2007. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia*: 578: 113-129.
- Kagami, M.; Helmsing, N. R.; Van Donk, E.** 2011. Parasitic chytrids could promote copepod survival by mediating material transfer from inedible diatoms. *Hydrobiologia* 659: 49-54.
- Kagami, M., Miki, T. & Takimoto, G.** 2014. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2014.00166.
- Lamparelli, M.C.** 2004. Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 235 p.
- Lefèvre, E., Bardot, C., Noël, C., Carrias, J.F., Viscogliosi, E. et al.** 2007. Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeucakaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environmental Microbiology*: 9: 61-71.
- Lefèvre, E., Letcher, P. & Powell, M.** 2012. Temporal variation of small eukaryotic community in two freshwater lakes: emphasis on zoosporic fungi. *Aquatic microbial Ecology* 67: 91-105.
- Lefranc, M., Thénot, A., Lepère, C. & Debroas, D.** 2005. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trofic status. *Environmental Microbiology* 71: 5935-5942.
- Lepère, C., Domaizon I. & Debroas, D.** 2008. Unexpected importance of potencial parasites in the composition of the freshwater small-eukaryote community. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1029-1041.
- Lucinda, I.** 2003. Composição de Rotifera em corpos d'água da bacia do rio Tietê – São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. 199p.

- Marano, A.V., Zottarelli, C.L.A., Barrera, M.D. et al.** 2011. Diversity, role in decomposition, and succession of zoosporic fungi and straminipiles on submerged decaying leaves in a woodland stream. *Hydrobiologia* 659: 93-109.
- Margalef, R.** 1983. *Limnologia*. Omega, Barcelona.
- McCune, B. & Mefford, M.J.** 2011. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 6. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA.
- 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.
- Monchy, S., Sancier, G., Jobard, M., Rasconi. et al.** 2011. Exploring and quantifying fungal in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. *Environmental Biology* 13: 1433-1453.
- Müeller-Dombois, D. & Ellenberd, H.** 1974. Aims and methods of vegetation ecology. New York, John Wiley & Sons. pp. 547.
- 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.
- Pedrazzi, F.J.M., Conceição, F.T., Sardinha, D.S., Moschini-Carlos, V. et al.** 2014. Avaliação da qualidade da água do reservatório de Itupararanga, Bacia do Alto Sorocaba. *Geociências* 33: 26-38.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1990. Levantamento dos fungos zoospóricos da Represa do Lobo ("Broa"), São Carlos, SP, Brasil [Master dissertation]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 175 p.
- Plaats-Niterink, V.J.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Micology* 21: 1-244.
- Pusceddu, A., Gambi, C., Manini, E. & Danovaro, R.** 2007. Trophic state, ecosystem efficiency and biodiversity of transitional aquatic ecosystems: analysis of environmental quality based on different benthic indicators. *Journal of Chemical Ecology* 23: 505-515.
- Rasconi, S. Jobard, M., Jouve, L. & Sime-Ngando, T.** 2009. Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2545–2553.

- Rasconi, S.; Niquil, N.; Sime-Ngando, T.** 2012. Phytoplankton chytridiomycosis: community structure and infectivity of fungal parasites in aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, Bedford, v. 14, p. 2151–2170.
- Rasconi, S., Grami, B., Niquil, N., Jobard, M. *et al.*** 2014. Parasitic chytrids sustain zooplankton growth during inedible algal bloom. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-20.
- Rocha, M. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2002. Chytridiomycota o Oomycota da represa do Guarapiranga. *Acta Botanica Brasilica* 16: 287-309.
- Rocha, M.** 2004. Micota zoospórica de lagos com diferentes trofias do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Microbiologia para o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, p. 1-85.
- Sartory & Groberlaar.** 1984. Extraction of chlorophyll-a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hidrobiologia* 114: 177-187.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J. *et al.*** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation* 16: 49-67.
- Secchin, L.F.** 2012. Caracterização ambiental e estimativa da produção de cargas difusas na área de drenagem da represa de Itupararanga. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo: São Paulo. 122p.
- Slapeta, J., Moreira, D., Purificación, L.G.** 2005. The extend of protist diversity: insights from molecular ecology and freshwater. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 2073-2081.
- Smol, J.P.** 2008. Pollution of lakes and rivers: a paleoenvironmental perspective. Blackwell, 2 ed., Oxford University Press, New York.
- Sparrow, F. K.** 1968. The Fungi: An Advanced Treatise. *In*: Ainsworth, G.C. Sussman, A.S. (eds.). *The Fungal Population III*, Academic Press, New York.
- Tolmasquim, M.T.** 2012. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. *Estados Avuçados* 26: 247-260.
- Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T. & Tundisi, J.E.M.** 2008. Reservoirs and human well being: new challenges for evaluating impacts and benefits in the neotropics. *Brazilian Journal of Biology* 68: 1133-1135.
- Valderrama, G.C.** 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10: 109-122.
- Wurzbacher, C.M., Barlocher, F. & Grossart, H.P.** 2010. Fungi in lake ecosystems. *Aquatic microbial Ecology* 59: 125-149.

- Wurzbacher, C.M., Whartmann, N., Bourne, E., Attermeyer, K. et al.** 2016. High habitat-specific in fungal communities of oligo-mesotrophic temperate Lake Stechlin (North-West Germany). *Myckeys* 16: 17-44.
- Wetzel, R.G.** 2001. Structure and productivity of aquatic ecosystems. *In: Limnology*. Academic Press, San Diego, pp. 206.
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I. & Goedkoop, W.** 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – response at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* 152: 576-584.
- Wong, M.K.M., Goh, T.K., Hodgkiss, I.J. et al.** 1998. Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7: 1187-1206.
- Yang, X., & Hong, C.X.** 2015. Diversity and populations of *Phytophthora*, *Phytophthora* and *Pythium* species recovered from sediments in an agricultural run-off sedimentation reservoir. *Plant Pathology* 65: 1118-1125.
- 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.
- Zappia, R.E., Hüberli, D., Hardy, G.S.J. & Bayliss, K.L.** 2014. Fungi and oomycetes in open irrigation systems: knowledge gaps and biosecurity implications. *Plant Pathology* 63: 961-972.

CAPÍTULO 2

**NOVELTIES FOR THE *NOWAKOWSKIELLA* GENUS (CLADOCHYTRIALES;
CHYTRIDIOMYCETES): NEW SPECIES AND NEW COMBINATION**

Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Mycologia

Novelties for the *Nowakowskiella* genus (Cladochytriales; Chytridiomycetes): new species and new combination

Gustavo H. Jerônimo^{1*}, Ana L. Jesus¹, D. Rabern Simmons², Timothy Y. James², Carmen L.A. Pires-Zottarelli¹

¹ “Núcleo de Pesquisa em Micologia”, Instituto de Botânica, São Paulo, São Paulo 04301-902

² Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109-1085

* Corresponding author. Email: gejeronimo@hotmail.com

Abstract: Five *Nowakowskiella* species were identified and purified on nutrient agar and included in phylogenetic analyses, this being the first such study for four of these species. Our combined maximum likelihood analyses from SSU, 5.8S (ITS) and LSU regions of rDNA showed that *Nowakowskiella* is not a monophyletic clade due the position of *Nowakowskiella elongata*, which is more related to *Cladochytrium*. Therefore, we reclassify *N. elongata* as the type of the new genus *Karlingiella*, in addition to describing the new species *N. crenulata* within the monophyletic *Nowakowskiella*.

Key words: chytrid, *Karlingiella*, *Nowakowskiella crenulata*, phylogeny

INTRODUCTION

The advancement and popularization of molecular tools have deeply influenced the systematics of several groups of fungi. In the basal Chytridiomycota (chytrid fungi or chytrids), molecular data corroborating the relationships suggested by zoospore ultrastructure have revealed that the classical taxonomic system, based on convergently-derived thalli structures, is not phylogenetically accurate (Letcher *et al.* 2006; Letcher and Powell 2014). Thus, numerous nomenclatural changes have been proposed, including the description of new species, genera, families and orders (Letcher *et al.* 2005; James *et al.* 2006; Letcher *et al.* 2006; Mozley-Standridge *et al.* 2009; Simmons *et al.* 2009; Longcore and Simmons 2012; Vélez *et al.* 2013; Karpov *et al.* 2014) and major revisions and reclassifications of polyphyletic groups (Vélez *et al.* 2011; Letcher and Powell 2014).

The description of the Cladochytriales, to include some genera classically included in Chytridiales, was based on these species' monophyly, independent of the Chytridiales, in small (SSU) and large (LSU) subunit ribosomal DNA molecular phylogenies (Mozley-Standridge *et al.* 2009). Additionally, of those examined by transmission electron microscopy, they all produce zoospores with a unique constellation of ultrastructural characters (Lucarroti 1981, Mozley-Standridge *et al.* 2009). Representatives of this order have different types of development, reproductive structures, and ecological preferences. The polycentric genera *Nowakowskiella* Schröt. and *Cladochytrium* Nowak. are the largest of the order, yet only a few species have been isolated, cultured, and included in molecular phylogenies, keeping their interspecific relationships, and indeed their generic monophyly, uncertain.

Nowakowskiella was proposed by J. Schrot in 1893 to include the type species *N. elegans*, previously named *Cladochytrium elegans* Nowak. Over the years, several species have been described and currently this genus contains 18 legitimate species (Mycobank 2018), which are morphologically recognized by production of polycentric thalli, with operculated zoosporangia interconnected by rhizomycelia, which contain occasional non-septate swellings (Sparrow 1960; Karling 1977). Originally included in the Nowakowskiellaceae by Sparrow (1942), this genus was transferred shortly thereafter to Megachytriaceae (Sparrow 1943). However, neither family was validly published, and Mozley-Standridge *et al.* (2009) validly reinstated the original family name. Though taxa have been recently reshuffled in higher taxonomic groups, the last new species, *N. keratinophila* Hassan and Batko, was described around 20 years ago (Hassan & Batko 1988).

Therefore, the aim of this study is to introduce the new species *Nowakowskiella crenulata* Jerônimo & Pires-Zottarelli, include *N. multispora* Karling and *N. ramosa* Butler for the first time in phylogenetic reconstructions, besides to transfer *N. elongata* Karling to a new genus, *Karlingiella*, and increase the knowledge about the phylogenetic relationship within this order.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture.—Sediment surface, soil and water samples were collected on lentic and lotic freshwater habitats from several locations in the Brazilian Atlantic Rainforest (TABLE I). These samples were baited with cellulosic substrates (onion skin, corn leaves, and cellophane), infected substrates were aseptically removed and placed on nutrient agar medium, on which chytrids were further isolated into pure culture through the collection of aseptic zoospores and/or rhizomycelium onto fresh medium, including PmTG (1 g peptonized milk, 1 g tryptone, 5 g dextrose, 8 g agar, 0.5 g streptomycin sulfate, 0.5 g penicillin-G, 1 L deionized water), CMA plus glucose (16 g corn meal agar, 2.5 g glucose, 1 L deionized water) or YPSS/8 (4 g yeast extract, 15 g soluble starch, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ × 7 H₂O, 1 L deionized water). Pure cultures were deposited in the MMBF culture collection (“Micoteca Mário Barreto Figueiredo”) belonging to WFCC (World Federation for Culture Collections) and also to the CCIBt collection culture (“Coleção de Cultura de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica”). Additionally, the strains were cryopreserved according to the protocol of Boyle *et al.* (2003).

The collection culture or voucher numbers, the geographic coordinates and type of samples and habitats collected are showed in the TABLE I.

TABLE I. Species, collection culture or voucher numbers, geographic coordinates and type of samples and habitats collected for the 14 Cladochytriales strains isolated during this study.

Species	Collection culture or voucher numbers	Geographic coordinates	Municipality/State/Country	Samples (habitats)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4014	25°03'05"/25°18'18"S-47°53'48"/48°05'42"W	Cananéia/São Paulo State/Brazil	water (stream)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt3845	23°38'20,6"S/46°37'34,3"W	São Paulo/São Paulo State/Brazil	water (stream)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4263	23°25'33,72"S/47°35'42,66"W	Votorantim/São Paulo State/Brazil	water column (reservoir)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	ALJ05	24°30'25,09"S/47°15'42,08"W	Juréia/São Paulo State/Brazil	waterfall (stream)
<i>Nowakowskiella crenulata</i>	CCIBt4258	23°34'49,92"S/47°25'32,64"W	Votorantim/São Paulo State/Brazil	sediment surface (reservoir)
<i>Nowakowskiella crenulata</i>	CCIBt4259	23°34'54,30"S/47°26'12,12"W	Ibiúna/São Paulo State/Brazil	sediment surface (reservoir)
<i>Nowakowskiella elongata</i>	CCIBt4016	25°03'05"/25°18'18"S-47°53'48"/48°05'42"W	Cananéia/São Paulo State/Brazil	water (stream)

Species	Collection culture or voucher numbers	Geographic coordinates	Municipality/State/ Country	Samples (habitats)
<i>Nowakowskiella elongata</i>	ALJ09	24°30'04,07"S/47°15'58,0" W	Juréia/São Paulo State/Brazil	submerged leaves (river)
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i>	GHJ13	23°25'40,86"S/47°35'31,14" W	Cananéia/São Paulo State/Brazil	sediment surface (reservoir)
<i>Nowakowskiella multisporea</i>	CCIBt4015	25°03'05"/25°18'18"S-47°53'48"/48°05'42"W	Cananéia/São Paulo State/Brazil	water (stream)
<i>Nowakowskiella multisporea</i>	CCIBt3864	23°38'18,8"S/46°37'31,7"W	São Paulo/São Paulo State/Brazil	water (stream)
<i>Nowakowskiella ramosa</i>	CCIBt4294	23°34'49,92"S/47°25'32,64" W	Votorantim/São Paulo State/Brazil	water column (reservoir)
<i>Nowakowskiella</i> sp.1	CCIBt4260	23°34'58,56"S/47°25'50,52" W	Votorantim/São Paulo State/Brazil	sediment surface (reservoir)
<i>Nowakowskiella</i> sp.	ALJ23	24°22'51,04"S/47°20'39,0" W	Juréia/São Paulo State/Brazil	soil
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt4017	25°03'05"/25°18'18"S-47°53'48"/48°05'42"W	Cananéia/São Paulo State/Brazil	soil
<i>Polychytrium aggregatum</i>	ALJ30	24°32'28,1"S/47°12'38,08" W	Juréia/São Paulo State/Brazil	water (river)

Nowakowskiella species produce thick-walled resting spores that do not germinate on standard nutrient agar media, and these structures are indicative of certain species. In order to stimulate resting spore production, we cultivated our *Nowakowskiella* strains on YPSS/8 media prepared with soil water as described by Lucarotti (1981). Lucarotti argued that the micro-nutrients provided by the soil could stimulate the production of zoospores, and we proposed to test if the same theory held true to resting spore production. We applied 7 g of garden soil and 0.05 g calcium carbonate to 250 ml of distilled water, steamed this mixture for 2 hours during two consecutive days, and then filtered the solution twice with a Buchner funnel and Whatman n°1 filter paper to remove all particulate material. After that, the solution was diluted in the ratio of two parts of distilled water to 1 part of filtered solution, autoclaved, and used to prepare the YPSS/8 culture medium.

Morphology.—Pure cultures were observed growing in PmTG, CMA plus glucose and YPSS/8 broth and on purified cellulosic substrates (onion skin, cellophane and corn leaves). Examination of thallus morphology of all strains was performed on Leica DMLB2. We used the Sparrow (1960) and Karling (1977) bibliographies along with the original description of the species (Butler 1907, Shanor 1942, Karling 1944, 1963) to identify our isolates.

DNA extraction, amplification and sequencing.—For DNA extraction, a small piece of agar with zoosporeangia or rhizomycelium was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 ml of PmTG liquid medium prepared with autoclaved reserve-osmosis water. After incubation for 5-10 days at 21°C, the material was transferred to 2 mL microcentrifuge tubes to obtain pellets for DNA extraction procedure. The extraction of genomic DNA followed the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). Genomic DNA was visualized by electrophoresis of the extracts on a 0.8% agarose gel. Ribosomal regions were amplified with the PCR SuperMix kit (Invitrogen®) for a final volume of 25 µL, and the partial LSU, SSU and complete ITS regions of rDNA were amplified using the primers LR0R/LR5, SR1R/NS4 (Vilgalys and Hester 1990) and ITS4/ITS5 (White *et al.* 1990), respectively. Thermocycler parameters followed the cycle described in James *et al.* (2006). Amplicons were purified with AxyPrep PCR Clean-up kit (Axygen®) and sequenced at the “Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e células tronco, Universidade de São Paulo”. The contiguous sequences were assembled into SEQUENCHER 5.3.

Phylogenetic analyses.—For phylogenetic reconstruction, 24 isolates of Cladochytriales were selected (TABLE II), which represent the major genera with available sequences in GenBank while *Polychytrium aggregatum* strains (CCIBt4017, ALJ30 and JEL109) were used as Polychytriales outgroup taxa. In addition, we are including 14 new Cladochytriales strains isolated from different habitats at the Brazilian Atlantic Rainforest (TABLE I). The contiguous sequences were assembled using Sequencher™ version 4.1.4 (Gene Codes®) and alignment was performed online at Mafft version v. 7.058 (Kazutaka and Daron 2013). The regions SSU, 5.8S (ITS) and LSU were concatenated through SequenceMatrix v. 1.8 (Vaidya *et al.* 2010) resulting in a final length of 2427 base pairs. The Maximum Likelihood (ML) analysis was conducted in Garli v. 2.01 (Bazin et al. 2008) adding the partition models generated by jModel Test v. 2.2.4 (Posada 2008). We performed the ML analysis with 1000 bootstrap replicates and the values <70% were not shown in the final tree.

TABLE II. Species, strain/voucher and GenBank accession numbers. The isolates highlighted in bold have never been cultured, sequenced, or included in phylogenetic analyses. NA: Not available

Species	Strain/voucher	GenBank accession number		
		SSU	ITS	LSU
<i>Allochytridium luteum</i>	ATCC 60989	JN940948	NA	AY439066
<i>Catenochytridium</i> sp.	JEL 145	EU828475	NA	EU828503
<i>Catenochytridium</i> sp.	JEL 044	EU828478	NA	EU828506
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4263	MH590084	MH590046	MH590071
<i>Cladochytrium replicatum</i>	JEL 303	EU828461	NA	EU828488
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt3845	MH590085	MH590047	MH590072
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4390	MH590086	MH590048	MH590073
<i>Cladochytrium replicatum</i>	JEL 180	NG017169	NA	NG027614
<i>Cladochytrium replicatum</i>	WJD 123	NA	NA	KC691378
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt 4014	KJ464414	NA	KJ464415
<i>Cladochytrium</i> sp.	SMS 013	EU828459	NA	EU828486
<i>Cladochytrium</i> sp.	JEL 153	EU828458	NA	EU828485
<i>Cladochytrium</i> sp.	BR 696	JN940946	JN943816	JN941001
<i>Cylindrochytridium johnstonii</i>	JEL 596	JF796051	NA	JF796052
<i>Endochytriaceae</i>	JEL 072	EU828470	NA	EU828497
<i>Endochytrium ramosum</i>	JEL 402	EU828484	NA	EU828513
<i>Endochytrium</i> sp.	JEL 324	AY635844	AY997044	DQ273816
<i>Nephrochytrium</i> sp.	JEL 125	AH009049	NA	EU828511
<i>Nowakowskiella elegans</i>	M 29	NA	AY353257	AY349080
<i>Nowakowskiella elegans</i>	JEL 046	EU828463	NA	EU828490
<i>Nowakowskiella elegans</i>	UCB 50 1	EU828464	NA	EU828491
<i>Nowakowskiella elegans</i>	JEL 157	EU828465	NA	EU828492
<i>Nowakowskiella elongata</i>	CCIBt4016	MH590087	MH590049	MH590074
<i>Nowakowskiella elongata</i>	ALJ09	NA	MH590050	MH590075
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i>	GHJ13	MH590088	MH590051	MH590076
<i>Nowakowskiella multisporea</i>	CCIBt3864	MH590089	MH590052	MH590077
<i>Nowakowskiella multisporea</i>	CCIBt4015	KJ539147	KJ539148	KJ539149
<i>Nowakowskiella ramosa</i>	CCIBt4294	MH590090	NA	MH590078
<i>Nowakowskiella</i> sp.	ALJ 23	MH590091	MH590053	MH590079

Species	Strain/voucher	GenBank accession number		
		SSU	ITS	LSU
<i>Nowakowskiella elegans</i>	JEL 127	EU828466	NA	DQ273798
<i>Nowakowskiella</i> sp.	JH HBR	EU828469	NA	EU828496
<i>Nowakowskiella</i> sp.	JH CC2	EU828481	NA	EU828509
<i>Nowakowskiella</i> sp.	JH AS	EU828482	NA	EU828510
<i>Nowakowskiella crenulata</i>	CCIBt4258	MH590092	MH590054	MH590080
<i>Nowakowskiella crenulata</i>	CCIBt4259	MH590093	MH590055	MH590081
<i>Nowakowskiella</i> sp.1	CCIBt4260	MH590094	MH590056	MH590082
<i>Polychytrium aggregatum</i>	JEL 109	NG017168	AY997074	AY349084
<i>Polychytrium aggregatum</i>	ALJ30	MH590095	MH590057	MH590083
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt 4017	KJ464408	KJ464409	KJ464410
<i>Septochytrium</i> sp.	JEL 177	EU828474	NA	EU828502
<i>Septochytrium variabile</i>	JEL 191	EU828483	NA	EU828512

RESULTS

We were able to isolate 10 *Nowakowskiella* strains (TABLE I and II), six of which could be identified as described species. The YPSS/8 soil media was effective at stimulating the resting spore production of *Nowakowskiella crenulata*, but the same was not observed with two unidentified strains, *Nowakowskiella* sp.1 CCIBt4260 and *Nowakowskiella* sp. ALJ23, which only produced zoosporangia. Considering this, we decided to maintain our identification of these both strains at generic level.

Brief morphological comments besides some pictures were included below considering the poor availability information on these taxa.

Morphology.—*Nowakowskiella ramosa* Butler produces spherical to pyriform zoosporangia and resistance structures with a parenchymal region (Pr), which support a single or up to three resting spores with small incrustation in the wall (FIG. 1A–C). *N. hemisphaerospora* produces ovoid to pyriform zoosporangia and septate resting spores, that form two hemispheres, in which all contents migrate to one side while the other remains empty (FIG. 1D,E). *N. multispora* produces subspherical to pyriform zoosporangia and intercalary resistance structures, formed by consecutive and linked resting spores with a homogenous content (FIG. 1F,G). *Nowakowskiella* sp.1 (FIG. 1H–

N) produces intercalary or terminal zoosporangia, which are commonly spherical, subspherical or pyriform in shape (FIG. 1H–L), with a small discharge tube (FIG. 1K,N). Additionally, prominent apophyses were observed (FIG. 1L) that are produced on both sides of the zoosporangia when the development are intercalary. The zoospores have a single hyaline lipid globule (FIG. 1M) and are released in a membrane-bound mass (FIG. 1K), in which the zoospores remain immobile for a short period before becoming mobile and rupturing the binding membrane.

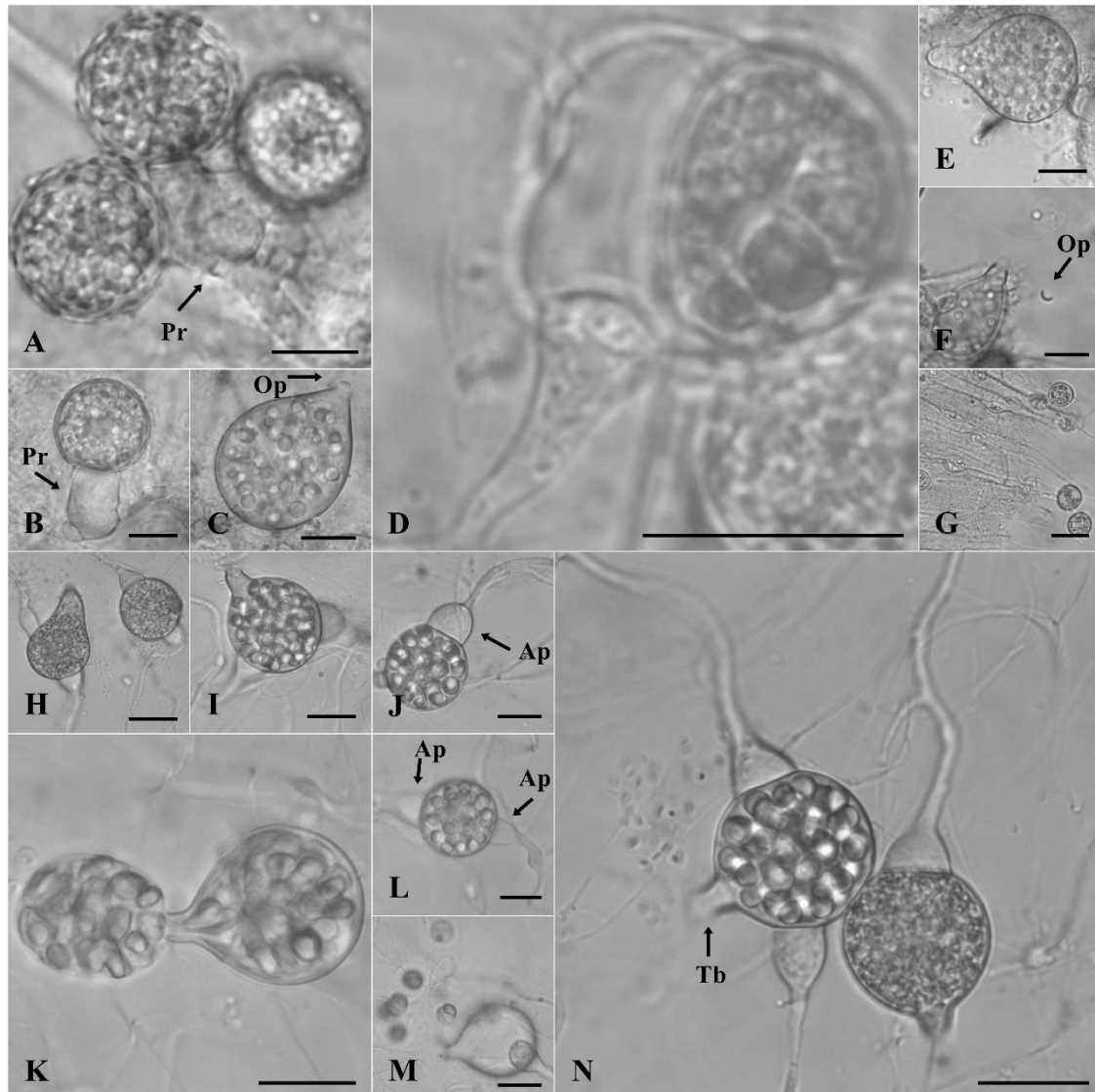


FIG. 1. Zoosporangia and resting spores morphology of *Nowakowskiella ramosa*, *N. hemisphaerospora*, *N. multisporea* and *Nowakowskiella* sp.1 CCIBt4260. A-C. *Nowakowskiella ramosa* CCIBt4294. A-B. Ornamentate resting spores with a parenchymal region (Pr). C. Operculate (Op) zoosporangia. D-E. *Nowakowskiella hemisphaerospora* GHJ13. D. Septate resting spores. E. Pyriform zoosporangia. F-G. *Nowakowskiella multisporea* CCIBt4015. F. Operculate (Op) zoosporangia. G. Resting spores. H-N. *Nowakowskiella* sp. 1 CCIBt4260. H, I, J and L. Intercalary apophysate (Ap) zoosporangia. K, M. Zoospores discharge. N. Mature and immature intercalary zoosporangia with a discharge tube (Tb). Ap: Apophysis. Op: Operculum. Pr: Parenchymal region. Tb: discharge tube. Bars=10µm.

Phylogenetic analyses.—The combined data (SSU, 5.8S and LSU of the rDNA) had 2427 characters, with 1186 parsimony-informative sites. jModelTest indicated the most appropriate models of DNA substitution were TrNef+I (SSU), TPM1uf+G (5.8S-ITS) and TIM3ef+I+G (LSU), according to AIC criteria. Two strongly supported clades were observed in our phylogenetic reconstruction, which represent the Nowakowskiellaceae and Cladochytriaceae families proposed by Mozley-Standridge *et al.* (2009), though internal configurations are altered and support values, specifically for the Nowakowskiellaceae, are diminished (FIG. 2). In Nowakowskiellaceae, *N. ramosa* and *Nowakowskiella* sp. (ALJ23) are sister group of the type species (*N. elegans*), the new species *N. crenulata* is related to *Nowakowskiella* sp.1 (CCIBt4260), and *N. multispora* in on a basal branch to other taxa in this genus. Clades of cultures identified as *N. elegans* and *Cladochytrium replicatum* were monophyletic, respective to the species, but internal branches suggest that these species could represent multiples lineages or possibly even additional species, though more study would be required. In addition, the phylogenetic placement of our *Nowakowskiella elongata* strains indicate that this species is not associated to the other *Nowakowskiella* representatives and belongs within the new genus named as *Karlingiella*, related to Cladochytriaceae and *Nephrochytrium* sp. JEL125.

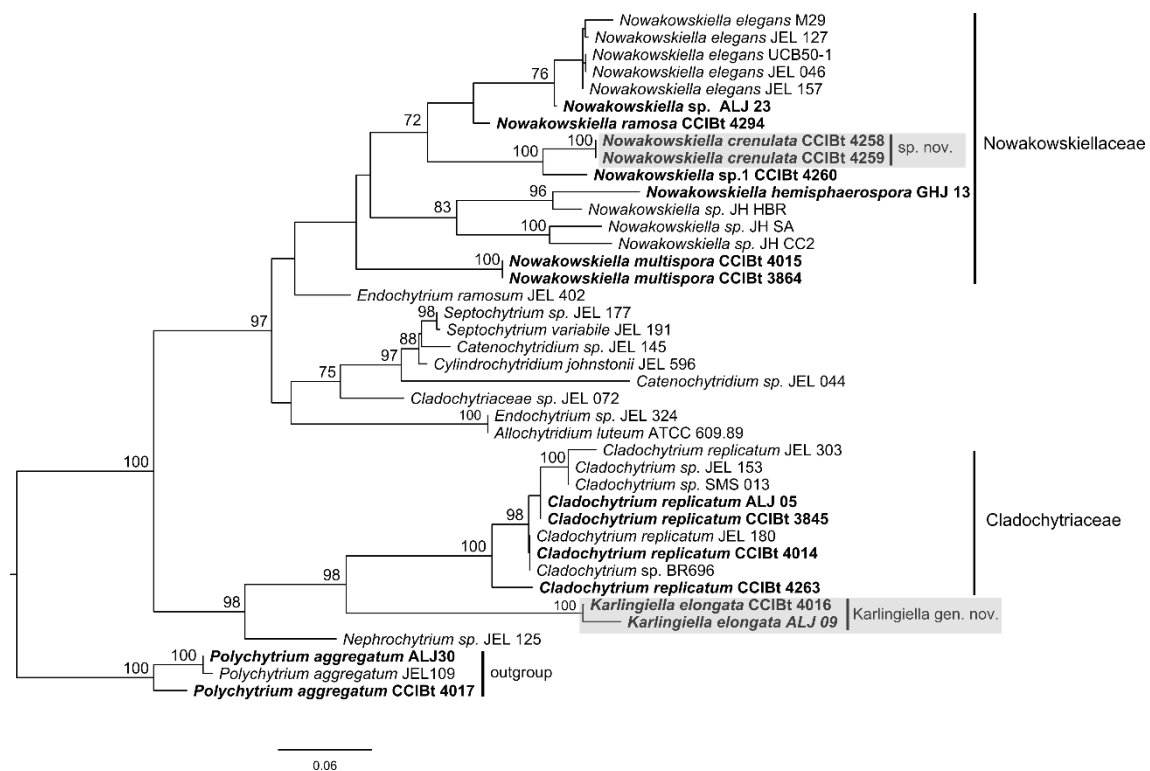


FIG. 2. Phylogram inferred from Maximum Likelihood (ML) analyses of 37 ingroup isolates in Cladochytriales order based on combined (SSU+5.8S+LSU) sequences data. Numbers at nodes represent

ML values. Strains highlighted in bold were isolated during this study and in grey represent the taxonomic novelties.

TAXONOMY

We are proposing the new species, *Nowakowskiella crenulata* Jeronimo & Pires-Zottarelli, based on the singular morphology of the zoosporangia and resting spores, along with its phylogenetic placement. This species was isolated from sediment reservoir samples and produces a characteristic resting spore (with crenulated ornamentations and a septum delimiting the branch that supports this structure) and zoosporangia with prominent and clavate apophyses. Also, we are transferring the species *Nowakowskiella elongata* Karling to the new genus *Karlingiella* Jerônimo, Jesus & Pires-Zottarelli, based on its disparate phylogenetic position as sister to the Cladochytriaceae.

Nowakowskiella crenulata G.H. Jerônimo and C.L.A. Pires-Zottarelli, sp. nov.

FIG. 3A-J

Typification: BRAZIL. SÃO PAULO. Votorantim, Santa Helena reservoir, (23°34'54,30"S-47°26'12,12"W), from sediment samples baited with cellulosic substrates (onion skin and corn leaves), 20 Mar 2014. Holotype preserved in lactophenol and cotton blue and deposited in Herbarium SP. Ex-type, *G.H. Jerônimo CCIBt4258* and paratype *G.H. Jerônimo CCIBt4259*. GenBank: SSU: MH590092, MH590093; ITS: MH590054, MH590055; LSU: MH590080, MH590081.

Fungus saprophytic. Polycentric rhizoidal system, branched, profuse, with numerous non-septate swellings, broadly fusiform $4.5\text{-}5.0 \times 3.0\text{-}4.5 \mu\text{m}$ or spherical $3.0\text{-}5.0 \mu\text{m}$. Zoosporangia terminal, occasionally intercalary, hyaline, smooth, spherical $20\text{-}23 \mu\text{m}$, subspherical $19\text{-}24 \times 20\text{-}27 \mu\text{m}$ or ovoid $21\text{-}25 \times 23\text{-}30 \mu\text{m}$, usually apophysate, without a discharge tube; wall thin, smooth, colorless; operculum smooth. Apophysis clavate $10\text{-}25 \times 5.0\text{-}12 \mu\text{m}$ or nearly spherical $10\text{-}14 \mu\text{m}$. Zoospores spherical, $2\text{-}3 \mu\text{m}$ in diameter, with a single hyaline lipid globule. Resting spores spherical $7.0\text{-}7.5 \mu\text{m}$ or subspherical $7.0\text{-}7.5 \times 7.0\text{-}7.5 \mu\text{m}$ in diameter, ornate with crenulated invaginations in the wall and supported by a septate branch.

Etymology: The specific epithet refers to the shape of the resting spores, which produces small crenulated invaginations in the wall.

Notes. The strains CCIBt4258 and CCIBt4259 grow indeterminantly on PmTG, CMA plus glucose or even YPSS/8 media, but the resting spores production was only observed in YPSS/8 broth. Both strains were isolated from sediment surface samples in a oligotrophic reservoir (“Santa Helena” - 23°34’49,92”S-47°25’32,64”W), but we were also able to bait it from sediment samples in a eutrophic reservoir (“Hedberg” - 23°25’40,86”S-47°35’31,04”W).

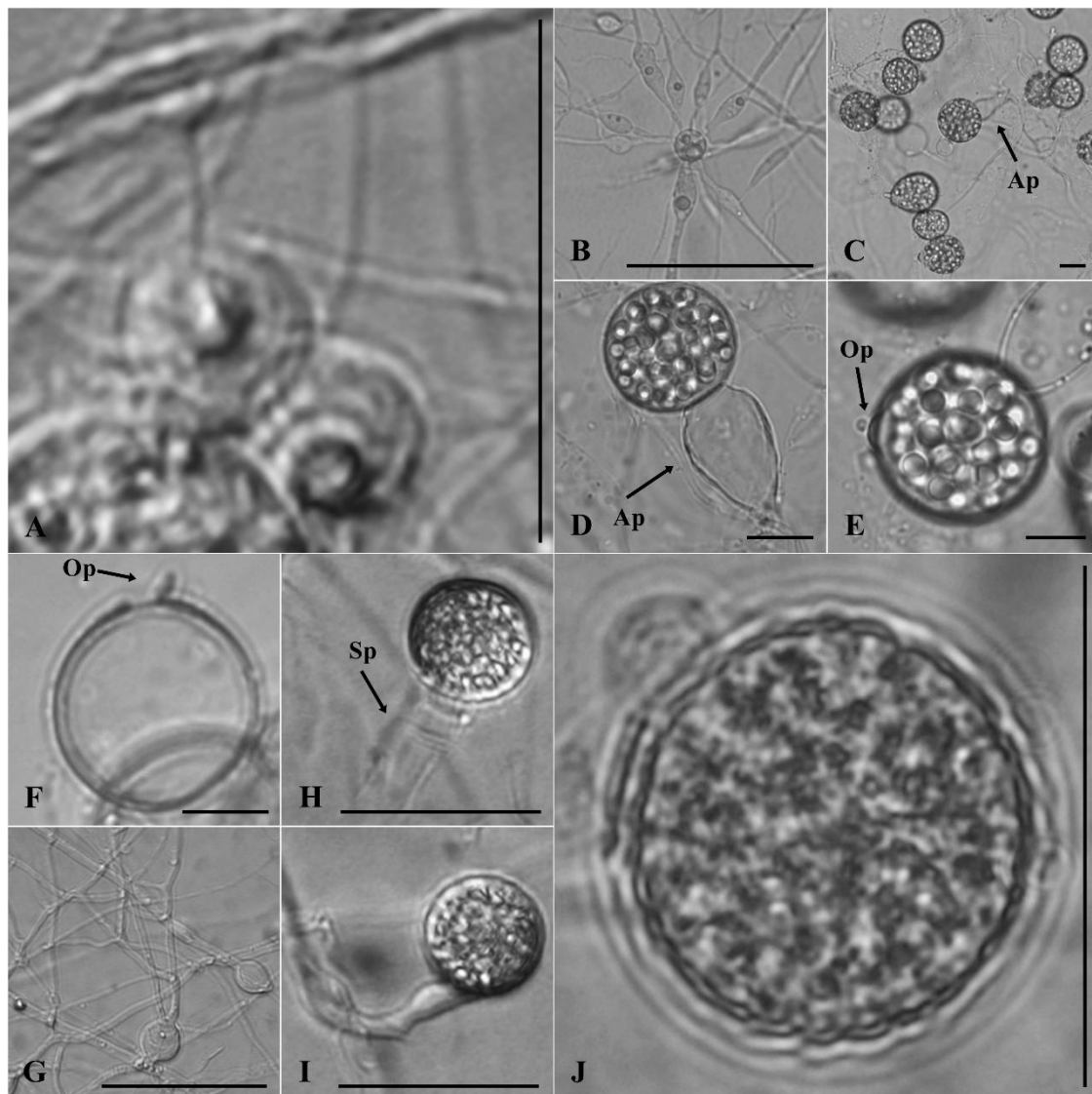


FIG. 3. Morphology of *Nowakowskiella crenulata* on onion skin and YPSS/8 broth. A. Encysted zoospores in YPSS/8. B. Early development stages in YPSS/8 broth. C-D. Zoosporangia and prominent clavate apophysis (Ap) on onion skin. E-F. Operculate zoosporangia (Op) on onion skin. G. Rhizomycellium with non-septate swellings in YPSS/8. H-J. Crenulate resting spores with a delimiting septum (Sp) in YPSS/8. Ap: Apophysis. Op: Operculum. Sp: Septum. Bars=10μm.

Karlingiella Jerônimo, Jesus and Pires-Zottarelli, gen. et. nov.

Fungus saprophytic. Polycentric rhizoidal system, branched, profuse, with numerous non-septate swellings. Operculate zoosporangia, terminal or intercalary, which could produce a basal sterile portion, elongate, cylindrical or globose. Zoospores spherical, with a single hyaline lipid globule. Resting spores intercalary, spherical or oval, hyaline, containing a large refractive globule.

Etymology: The prefix of the genus name is proposed to honor the researcher John S. Karling, who originally described several *Nowakowskiella* species during his visit to the Brazilian Amazon Jungle, including *N. elongata*.

Type species: *Karlingiella elongata* (Karling) Jerônimo, Jesus and Pires-Zottarelli

Karlingiella elongata (Karling) Jerônimo, Jesus and Pires-Zottarelli, comb. nov.

FIG.4A-I

Basionym: *Nowakowskiella elongata* Karling

Typification: As Karling did not designate a type in the original description (Karling 1944), we considered the illustrations (FIGS. 30-44 Karling 1944) as the lectotype.

Fungus saprophytic. Polycentric rhizoidal system, branched, profuse, with numerous non-septate swellings, broadly fusiform $7-15 \times 5-8 \mu\text{m}$ or spherical $6-15 \mu\text{m}$. Zoosporangia terminal or intercalary, frequently with a basal septate sterile portion, curved, elongate $25-85 \times 10-33 \mu\text{m}$, with an apical operculum. Zoospores spherical, $4-6 \mu\text{m}$ with a single hyaline lipid globule, forming a temporary globular mass during the realizing process. Intercalary resting spores, commonly spherical $16.5-33 \mu\text{m}$, oval $20-25 \times 18-23 \mu\text{m}$, hyaline, with a large refractive globule surrounded by several smaller droplets.

Diagnosis based on the strains CCIBt4016 and ALJ09.

Specimens examined: BRAZIL. SÃO PAULO. Cananéia, Ilha do Cardoso, ($25^{\circ}03'05''/25^{\circ}18'18''\text{S}-47^{\circ}53'48''/48^{\circ}05'42''\text{W}$), soil sample from an Atlantic rainforest area, baited with cellulosic substrates (onion skin and corn leaves), 6 Nov. 2012, G.H. Jerônimo CCIBt 4016. GenBank: SSU: MH590087; ITS: MH590049; LSU: MH590074.

BRAZIL. SÃO PAULO. JURÉIA, “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, (24°30′04,07”S/47°15′58,0”W), from submerged leaves samples in a Atlantic Rainforest stream, baited with cellulosic substrates (onion skin and corn leaves), 24 Aug 2016, A. L. Jesus ALJ09. GenBank: ITS: MH590050; LSU: MH590075.

Notes: The morphologies of our isolates fit Karlings’s (1944) description of *N. elongata*, with no additional or contradictory characteristics. These strains grow indeterminantly on PmTG, CMA plus glucose or even YPSS/8 media. On agar media, the cultures are predominantly rhizomycelial, but zoosporangia and resting spores are produced occasionally. The elongated or cylindrical zoosporangia were commonly observed on cellulosic baits (onion skin and corn leaves).

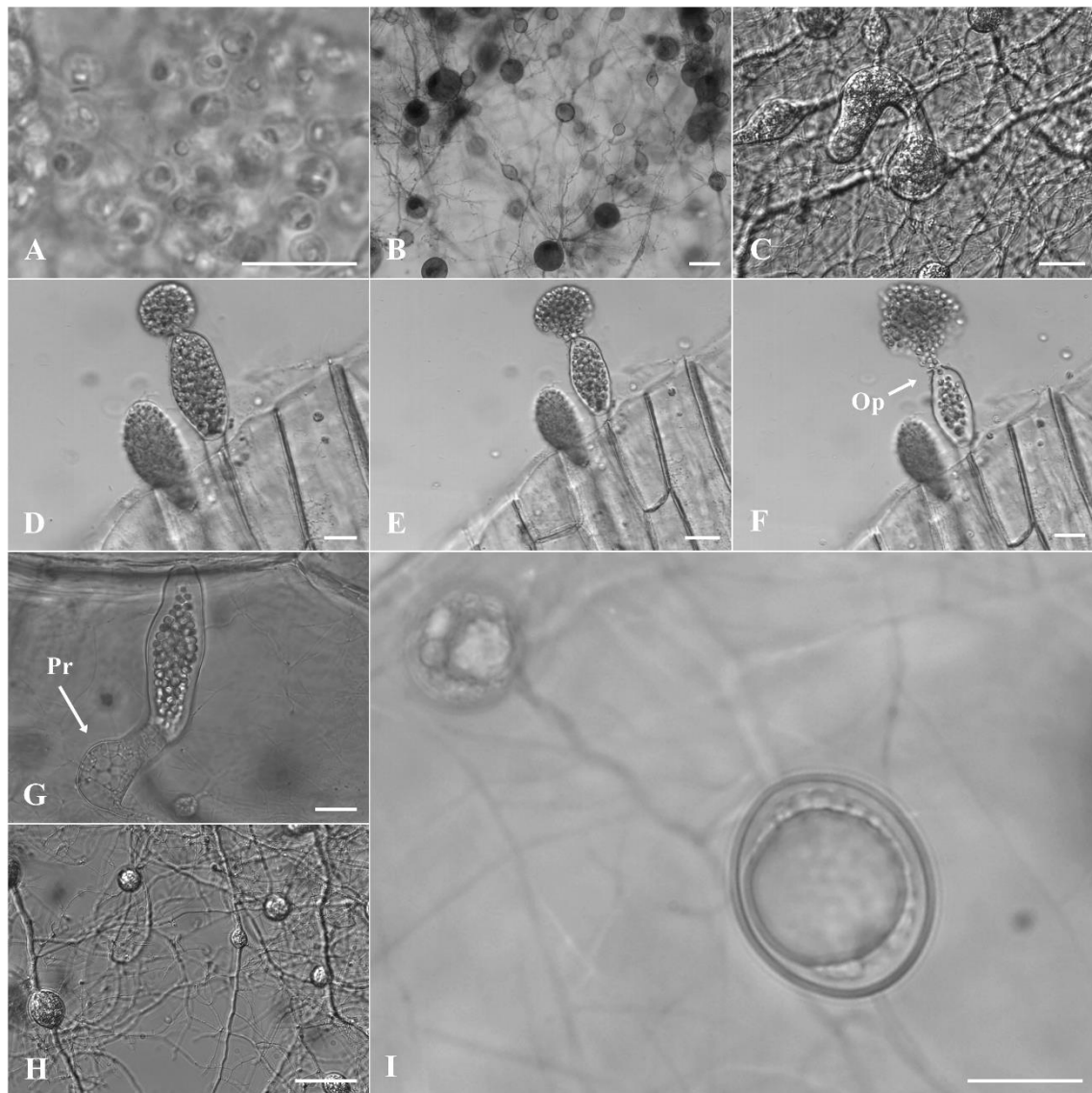


FIG 4. Morphology of *Karlingiella elongata*. A. Zoospores with a single hyaline lipid globule. B. Zoosporangia and rhizomycelium in PmTG medium. C. Intercalary zoosporangia with elongate tube in YPSS/8. D-F. Zoospores releasing and operculum (Op) in onion skin. G. Zoosporangium with a

parenchymal basal region (Pr) in onion skin. H. Rhizomycelium and non-septate swellings on PmTG. I. Resting spores with a large lipid globule surrounded by small droplets in PmTG. Op: Operculum. Pr: Parenchymal region. Bars=10µm.

DISCUSSION

Although *Nowakowskiella* is composed by numerous species, this genus is still poorly studied phylogenetically with only *Nowakowskiella elegans* Nowak. and *N. hemisphaerospora* Shanor representing the genus in phylogenetic studies (Mozley-Standridge *et al.* 2009). In our combined phylogenetic analyses, *Nowakowskiella* does not represent a monophyletic genus due to the placement of *N. elongata* Karling. In our combined rDNA phylogeny, this species is sister to the Cladochytriaceae. Based on this placement, we transferred *N. elongata* to the new genus *Karlingiella* as the new combination *Karlingiella elongata*. Additionally, we described the new species *Nowakowskiella crenulata*, which produces a crenulate resting spore and zoosporangia supported by a prominent clavate apophysis. Our phylogeny represents the largest analysis of the genus to date, and provides a phylogenetic backbone for the interspecific relationships within *Nowakowskiella*. Branch lengths are long, and support values are low, leaving a definitive phylogeny unknown until additional cultures can be examined.

As the morphological delineation of the *Nowakowskiella* species are based mainly on resting spores development, we decided to maintain the identification of the strains CCIBt4260 and ALJ27 at the generic level, although our phylogenetic analyses and zoosporangia morphology have indicated that they could represent new species.

Despite *Nowakowskiella ramosa* being one of the first described species in this genus, it has not been commonly reported in biodiversity studies, though it was recorded twice in Brazil (Karling 1944; Booth 1979). On the other hand, the other *Nowakowskiella* representatives isolated during this study (*N. multispora* and *N. hemisphaerospora*) have been commonly reported in taxonomic studies in Brazil, especially in Atlantic rainforest areas (Nascimento and Pires-Zottarelli 2009; Jesus *et al.* 2013; Jerônimo *et al.* 2015). The records of *N. crenulata* in sediment samples of two reservoirs with opposite trophic states (oligotrophic and eutrophic) is an indication that this species could survive in a wide range of limnological conditions, probably due the production of resting spores.

This study brings important information about interrelationship of the *Nowakowskiella* species, including four taxa in molecular phylogenetic reconstructions

for the first time, describing a new species, a new genus and a new combination, and contribute to increase the knowledge about the morphology and phylogenetic diversity.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fapesp (“Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo”) through scholarships awarded to G.H. Jerônimo (Nº process 2014/16358-4 and 2016/25800-6 - BEPE), A.L. Jesus (Nº process 2016/00697-0) and C.L.A. Pires-Zottarelli (Nº process 2012/50222-7 and 2016/11146-4). We are indebted to CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”), which supported G.H. Jerônimo during his master degree and CNPq for the productive fellowship given to C.L.A. Pires-Zottarelli (304493/2015-5). In addition, we are grateful to the University of Michigan, Department of Ecology and Evolutionary Biology and all of the Michigan Mycology lab team, for making me feel at home during the BEPE project period. Additionally, we thank the thematic Acquased project (FAPESP Process Nº 2009/53898-9) for the productivity fellowship awarded to C.L.A. Pires Zottarelli (Process Nº 304493/2015-5). To conclude, Lucas Michelotti, Denise C. Bicudo, Samantha B. Faustino, Elaine C.R. Bartozek, Stefano Zorzal de Almeida, Maria A.P.C. da Silva (Dorinha) are recognized for their contribution collecting samples or laboratory support, and we thank “Instituto Florestal” and “Grupo Votorantim” for the permission given to collect samples.

LITERATURE CITED

- Bazinet AL, Cummings MO. 2008. The lattice project: a grid research and production environment combining multiple grid computing models. *In: Distributed & Grid Supporting Communities* (Weber MHW, ed.) Marbug: Rechenkraft.net, pp 2-13.
- Booth T. 1979. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. *Revista de Microbiologia* 10: 123-138.
- Boyle D G, Hyatt AD, Daszak P, Berger L, Longcore J. E, Porter D, Hengstberger SG, Olsen V. 2013. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:59–64.
- Butler EJ. 1907. An account of the genus *Pythium* and some Chytridiaceae. *Memorians of the Department of Agriculture India, Botanical Series* 1: 1–160.
- Hassan, S.K.M. & Batko, A. 1988. *Nowakowskiella keratinophila* sp. nov. a keratinophilic fungus from the brackish water. *Acta Mycologica Warszawa* 22: 193-198.
- James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R. 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98:860–871.
- Jerônimo GH, Jesus AL, Marano AV, James TY, de Souza JI, Rocha SCO, Pires-Zottarelli CLA. 2015. Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Brasil. *Hoehnea* 42: 135-163
- Jesus AL, Marano AV, Schoenlein-Crusius IH, Pires-Zottarelli CLA. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40: 167-180.
- Karling JS. 1944. Brazilian chytrids. I. Species of *Nowakowskiella*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 71: 374–389.
- . 1963. Indian chytrids. IV. *Nowakowskiella multispora* sp. nov. and other polycentric species. *Sydowia* 17: 314–319.
- . 1977. *Chytridiomycetorum Iconographia*. Vaduz, J. Cramer.

- Karpov SA, Kobseva AA, Mamkaeva MA, Mamkaeva KA, Mikhailov KV, Mirzaeva GS, Aleoshin VV. 2014. *Gromochytrium mamkaevae* gen & sp. nov. and two new orders: Gromochytriales and Mesochytriales (Chytridiomycetes). *Persoonia* 32:115–126.
- Kazutaka K, Daron M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Available from: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server> (accessed 27 March 2018).
- Letcher PM, Powell MJ. 2005. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* 80: 115–133.
- , ———. Churchill PF, Chamber JG. 2006. Ultrastructural and molecular deliniation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898–915.
- , ———. 2014. Hypothesized evolutionary trends in zoospore ultrastructural characters in Chytridiales (Chytridiomycota). *Mycologia*, 106: 379–396.
- Longcore JE, Simmons DR. 2012. The Polychytriales ord. nov.contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. *Mycologia* 104:276–294.
- Lucarotti CJ. Zoospore ultrastructure of *Nowakowskiella elegans* and *Cladochytrium replicatum* (Chytridiales). *Canadian Journal of Botany* 59:137–148.
- Mozley-Standridge SE, Letcher PM, Longcore JE, Porter D, Simmons DR. 2009. Cladochytriales—a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research* 113:498–507.
- Nascimento CA, Pires-Zottarelli CLA. 2009. Chytriales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23: 459–473.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2: 1253–1256.
- Shanor L. 1942. A new fungus belonging to the Cladochytriaceae. *American Journal of Botany* 29: 174–179.
- Simmons DR, James TY, Meyer AF, Longcore JE. 2009. Lobulomycetales, a new order in the Chytridiomycota. *Mycological Research* 113:450–460.

- Sparrow FK. 1942. A classification of aquatic phycomycetes. *Mycologia* 34: 113–116.
- . 1943. The aquatic Phycomycetes, exclusive of the Saprolegniaceae and *Pythium*. University of Michigan Press. Ann Arbor,
- . 1960. Aquatic Phycomycetes. University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Vélez CG, Letcher PM, Schultz S, Mataloni G, Lefevre E, Powell MJ. 2013. Three new genera from aquatic habitats in Argentina. *Mycologia* 105:1251–1265.
- , ———, ———, Powell MJ, Churchill PF. 2011. Molecular phylogenetic and zoospore ultrastructural analyses of *Chytridium olla* establish the limits of a monophyletic Chytridiales. *Mycologia* 103:118–130.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171–180.
- Vilgalys R, Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Part Three: Genetics and Evolution. Academic Press.

CAPÍTULO 3

***BOOTHIOMYCES ANGULOSUM*: A NEW COMBINATION INTO
TERRAMYCETACEAE (RHIZOPHYDIALES, CHYTRIDIOMYCOTA)**

Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Nova Hedwigia

***Boothiomyces angulosum*: a new combination into Terramycetaceae (Rhizophydiales, Chytridiomycota)**

Authors: Gustavo Henrique Jerônimo^{1*}, Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli¹, David Rabern Simmons² and Timothy Yong James²

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brazil

² Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

*corresponding author: gejeronimo@hotmail.com

With 25 figures and 1 table

Abstract: The genus *Rhizophydium* was proposed by A. Schenk in 1858 to accommodate the inoperculate taxa previously inserted in *Chytridium*. This genus, which has already included 235 species, have been segregated in different genera based on molecular and zoospore ultrastructural analyses. However, some taxa have never been investigated about its phylogenetic position or zoospore ultrastructural characters. The aim of this study is to discuss, through morphology, zoospore ultrastructure and/or molecular analyzes, the relation of our isolates of *Rhizophydium angulosum* and *R. elyense* in the Rhizophydiales phylogeny. These isolates produced angular zoosporangia, characteristic of the Terramycetaceae representatives, and grouped within *Boothiomyces* clade, considering the concatenate analyses of complete ITS and partial LSU regions of rDNA. The transmission electronic microscopy (TEM) analyses revealed that *R. angulosum* produces zoospores with the same ultrastructural characters described to *Boothiomyces* representatives, while *R. elyense* presented sufficient characteristics that supports its morphological delineation from *Boothiomyces macroporosum*. Based on molecular and ultrastructural analyses, we are transferring *R. angulosum* to *Boothiomyces* genus besides to debate the morphology of its representatives.

Key words: chytrid, phylogeny, *Rhizophydium*, ultrastructure

Introduction

The genus *Rhizophydium* was proposed by A. Schenk in 1858 to accommodate the inoperculate taxa previously inserted in *Chytridium* (Letcher *et al.* 2006). The morphological delineation encompassed around 235 species, which were in the general characterized by production of eucarpic, monocentric and inoperculate thallus, differing by the shape and size of zoosporangia, number and position of discharge pores and relation with substratum or host (Sparrow 1960). However, the circumscription of the species within the genus was complex because the taxa present a few morphological distinctions and according to Sparrow (1960), the number of discharge pores, the size and shape of the zoosporangia and the nature of the substratum, are not always decisive. Thus, different approaches as zoospores ultrastructure and molecular analyses have been used to understand the evolutionary relation among the taxa classified in this genus.

Barr (1978, 1980) showed that *Rhizophydium* species, included in this time in Chytridiales, produced zoospores with a unique ultrastructural configuration, differing from other members of Chytridiales. In the following years, with the advance of the molecular methods allied to the ultrastructural tools, the genus *Rhizophydium* was segregated in 11 clades (Letcher *et al.* 2006, 2008a, 2015) and new genera and species were proposed (Letcher & Powell 2005; Lepelletier *et al.* 2014; Letcher *et al.* 2008a,b, 2012, 2015; Powell *et al.* 2011), which were grouped in the Rhizophydiales. Currently, this order comprises 16 families (Letcher *et al.* 2015), which differ by zoospore ultrastructural configuration, molecular placement and morphological characteristics. Among them, Terramycetaceae Letcher includes two genera, *Terramyces* Letcher and *Boothiomyces* Letcher, which produce zoosporangia predominantly angular in shape and zoospores with a similar ultrastructural configuration. However, subtle ultrastructural differences were observed by the authors as the type of cisterna and shape of the structure associated to kinetosome (KAS) (Letcher *et al.* 2006).

Considering all described species, some of them were not purified neither investigated regarding the zoospore ultrastructural configuration and molecular placement. Among these is *Rhizophydium angulosum* Karling, which is characterized by production of zoosporangia that occur singly or in aggregates, predominantly angular in shape but also with subspherical, irregularly clavate, stellate, ovoid, pyriform or citriform forms. The pores are apical, subapical or lateral, and rhizoidal system is composed by abundant and finely branched rhizoids (Karling 1968).

The aim of this study is to investigate, through morphology, zoospore ultrastructure as well as molecular analyzes, the position of *R. angulosum* into the Rhizophydiales phylogeny. In addition, we discussed the phylogenetic relationship of *Rhizophydium elyense* Sparrow.

Materials and methods

Isolation and culture

Sediment surface samples were collected in the Itupararanga reservoir (23°45'37"-23°35'02"S/47°21'00"-46°57'29"W), located in a protected Atlantic Rainforest area at São Paulo state, Brazil. These samples were baited with shrimp exoskeleton, snakeskin and onion skin and posteriorly isolated on nutritive medium through zoospores inoculation. Thalli developed on nutrient medium (CMA plus glucose - 16 g corn meal agar, 2.5 g glucose, 1 L deionized water) was purified and posteriorly deposited in MMBF culture collection ("Micoteca Mário Barreto Figueiredo") belonging to WFCC (World Federation for Culture Collections) and CCIBt collection culture ("Coleção de Cultura de Algas, Fungos e Cianobáctérias do Instituto de Botânica"). Besides that, the strains were cryopreserved according to the protocol of Boyle *et al.* (2003).

Morphology

Cultures of the strains CCIBt4261 and GHJ30 were observed growing in CMA plus glucose and on purified shrimp exoskeleton and snakeskin. Examination of thallus morphology was performed on Leica DMLB2. We used Sparrow (1960) and Karling (1977) monographs besides the original descriptions (Sparrow 1957, Karling 1968) to identify morphologically these isolates.

DNA extraction, amplification and sequencing

For DNA extraction, a small piece of agar with zoosporangia was transferred to Erlenmeyer's containing 50 ml of PmTG liquid medium (peptonized milk, tryptone and glucose) prepared with autoclaved reserve-osmosis water. After incubation for 5-10 days at 21°C, the material was transferred to 2 mL microfuge tubes in order to obtain pellets for DNA extraction procedure. The extraction of genomic DNA followed the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen©). Electrophoresis was performed using 0.8% (p/v) agarose gel and the partial LSU and complete ITS regions of

rDNA were amplified using the primers LR0R/LR5 (Vilgalys & Hester 1990) and ITS4/ITS5 (White *et al.* 1990), respectively. The thermocycler parameters followed the cycle described by James *et al.* (2006). The ribosomal regions were amplified with the PCR SuperMix kit (Invitrogen©) for a final volume of 25 µL and the amplicons were purified with AxyPrep PCR Clean-up kit (Axygen©), and sequenced at the “Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e células tronco, Universidade de São Paulo”. The contiguous sequences were assembled into SEQUENCHER 5.3.

Phylogenetic analyses

For phylogenetic reconstruction, 36 isolates of Rhizophydiales were selected (Table 1), which represents genera with available sequences in GenBank while *Spizellomyces* representatives (SW001 and CBS66873) were used as outgroup taxa. Our contiguous sequences were assembled using Sequencher™ version 4.1.4 (Gene Codes®) and the alignment performed online at Mafft version v. 7.058 (Kazutaka & Daron 2013). The regions ITS and LSU of rDNA were concatenate through SequenceMatrix v. 1.8 (Vaidya *et al.* 2010) resulting in a final alignment of 1800 base pairs while the phylogeny was built on PhyML v. 3.1 (Guindon & Gascuel, 2003) adding the model generated by jModel Test v. 2.2.4 (Posada 2008). The Maximum Likelihood analysis was performed with 1000 bootstrap and the values below to the 70% were not inserted in the final tree.

Table 1. Isolates, GenBank accession number of ITS and LSU region of rDNA used in the analyses. The strains highlighted in bold represent the taxa isolated during this study.

Isolates	GenBank accession number	
	ITS	LSU
<i>Alphamyces chaetifer</i> ARG025	EF585646	EF585606
<i>Alphamyces chaetifer</i> ARG028	EF585649	EF585609
<i>Alphamyces chaetifer</i> ARG058	EF585663	EF585623
<i>Angulomyces argentinensis</i> ARG008	EF585635	EF585595
<i>Angulomyces argentinensis</i> ARG015	EF585640	EF585600
<i>Angulomyces argentinensis</i> ARG070	EF585667	EF585627
<i>Aquamyces chlorogonii</i> ARG018	EF585643	EF585603

Isolates	GenBank accession number	
	ITS	LSU
<i>Aquamyces chlorogonii</i> Barr102	DQ485600	DQ485536
<i>Boothiomyces macroporosum</i> PLAUS021	NR119591	
<i>Boothiomyces</i> sp. ARG040	EF585656	EF585616
<i>Globomyces pollinis-pini</i> ARG068	EF585665	EF585625
<i>Globomyces pollinis-pini</i> ARG069	EF585666	EF585626
<i>Gorgonomyces haynaldii</i> ARG024	EF585645	EF585605
<i>Gorgonomyces haynaldii</i> ARG026	EF585647	EF585607
<i>Gorgonomyces haynaldii</i> Barr106	DQ485601	DQ485537
<i>Kappamyces</i> sp. PL120	DQ485672	DQ485581
<i>Kappamyces</i> sp. PL117	EF585670	EF585630
<i>Pateramyces corrientinensis</i> ARG046	EF585657	EF585617
<i>Protrudomyces lateralis</i> ARG047	EF585658	EF585618
<i>Protrudomyces lateralis</i> ARG071	EF585668	EF585628
<i>Protrudomyces lateralis</i> ARG072	EF585669	EF585629
<i>Protrudomyces lateralis</i> Barr004	DQ485597	DQ485533
<i>Rhizophydium carpophilum</i> JEL134	DQ485612	DQ485548
<i>Rhizophydium angulosum</i> CCIBt4261		
<i>Rhizophydium elyense</i> GHJ30		
<i>Rhizophydium elyense</i> PLAUS9	AY439049	
<i>Rhizophydium sphaerotheca</i> BR89	JN943817	JN941000
<i>Rhizophydium</i> sp. PL139	DQ485677	DQ485586
<i>Rhizophydium</i> sp. PL010	DQ485638	DQ485566
<i>Rhizophydium</i> sp. PL073	DQ485660	
<i>Rhizophydium</i> sp. PL042	DQ485658	
<i>Rhizophydium</i> sp. Barr436	DQ485607	DQ485543
<i>Rhizophydium</i> sp. PLAUS002	DQ485632	
<i>Terramyces subangulosum</i> PL001	DQ485652	
<i>Terramyces subangulosum</i> PL003	DQ485653	AY439041
<i>Terramyces subangulosum</i> PL122	DQ485673	DQ485582
<i>Urceomyces sphaerocarpus</i> ARG038	EF585655	EF585615
<i>Urceomyces sphaerocarpus</i> ARG048	EF555659	EF555619

Isolates	GenBank accession number	
	ITS	LSU
<i>Spizellomyces punctatus</i> SW001	EU379241	EU379198
<i>Spizellomyces plurigibbosus</i> CBS66873	NR145374	JN941011

Transmission Electronic Microscopy (TEM) analyses

The fixation and transmission electronic microscopy (TEM) were performed according to the protocol described in Letcher & Powell (2005) and it is summarized with details at material and methods of this thesis (Pages. 34 to 46). We examined the presence or absence of a vesicular region, fibrillar bridge (connecting the kinetosome and non-flagellated centriole) and the type and extension of the cisterna. We also analyzed the shape of the structure associated to kinetosome (KAS), organization of the microtubules and relation of the microbody lipid complex (MLC) with the mitochondria.

Results

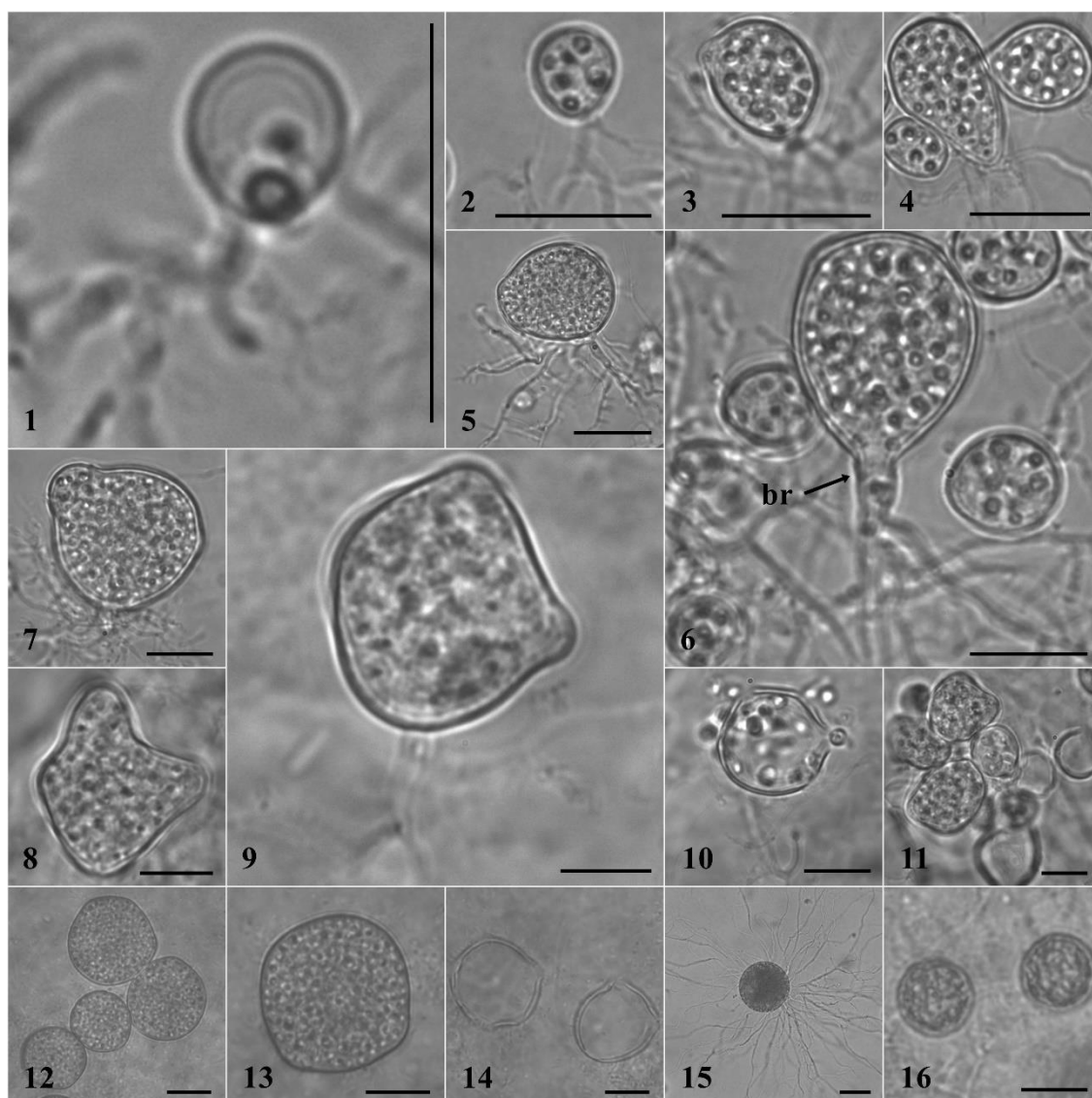
Our two strains (CCIBt4261 and GHJ30) produced angular zoosporangia with multiple discharge pores, which are typical of Terramycetaceae representatives.

Morphology

Figs 1-16

The strain CCIBt4261 was isolated from sediment surface sample at a depth of 19 meters in a mesotrophic reservoir (Itupararanga) (Figs. 1-11). It grows in chitin (shrimp exoskeleton) as well as cellulosic (onion skin) substrates and produces a characteristic aggregated development in baits (Fig. 11). In these substrates, the zoosporangia are predominantly angular or stellate (Figs. 8-9), while on nutrient agar the clavate, subspherical and reniform shapes were observed (Figs. 4-11). We are able to note on nutrient agar, zoosporangia with nearly angular shapes in the early stages of development (Figs. 1-3) besides production of a dilated region at the base (Fig. 6). The zoospores, usually released by two lateral pores, have a single hyaline lipid globule (Fig. 10). Considering all these morphological aspects, we identified this strain as *Rhizophydium angulosum* Karling.

The strain GHJ30 was isolated from sediment sample at the same mesotrophic reservoir (Itupararanga) using keratinous substrate (snakeskin) (Figs. 12-16). On snakeskin, it produces sessile and angular (polygonal) zoosporangia at maturity, which are mostly citriform in shape (Fig. 12 and 13). The rhizoids generally disconnect from the zoosporangia (sessile) and the zoospores with a single hyaline lipid globule are released through 2 or 3 pores (Fig. 14). The resting spores are spherical, small, smooth and produce a thick wall (Fig. 16). On nutrient agar, the zoosporangia are predominantly spherical, while the rhizoidal system are extensive, delicate and branched (Fig. 15). Considering all characteristics mentioned above we identified this strain as *Rhizophydium elyense* Sparrow.



Figures 1-16. Different development stages of *Rhizophydium angulosum* and *Rhizophydium elyense*. 1-11. Development stages of *Rhizophydium angulosum*. 1-3. Early development stages in nutrient agar medium. 4. Clavate zoosporangium in nutrient agar medium. 5. Reniform shape in nutrient agar medium. 6. Clavate zoosporangium with a prominent basal region (**br**) in nutrient agar medium. 7. Subspherical zoosporangium

with prominent papillae in nutrient agar medium. 8. Stellate shape in shrimp exoskeleton. 9. Angular shape in shrimp exoskeleton. 10. Zoospores releasing on shrimp exoskeleton. 11. Aggregated development on shrimp exoskeleton. 12-16. *Rhizophydium elyense*. 12-13. Citriform zoosporangia on snakeskin. 14. Empty zoosporangia showing pores on snakeskin. 15. Spherical shape in nutrient agar medium. 16. Resting spores on snakeskin. Scale bars: 10 μ m

Phylogenetic analyses

Fig 17

The combined alignment from complete ITS and partial LSU regions of rDNA had 1800 base pairs, from which 994 were parsimony-informative. The substitution model generated by jModelTest to combined regions was Tamura-Nei plus gamma shape distribution (TrN+G). The maximum likelihood analyses showed that our isolates grouped together with *Boothiomyces* representatives with a high bootstrap value (75%) (Fig. 17). Besides that, the strains GHJ30 and CCIBt4261 isolated from sediment samples in the Itupararanga reservoir, are sister taxa within *Boothiomyces* clade.

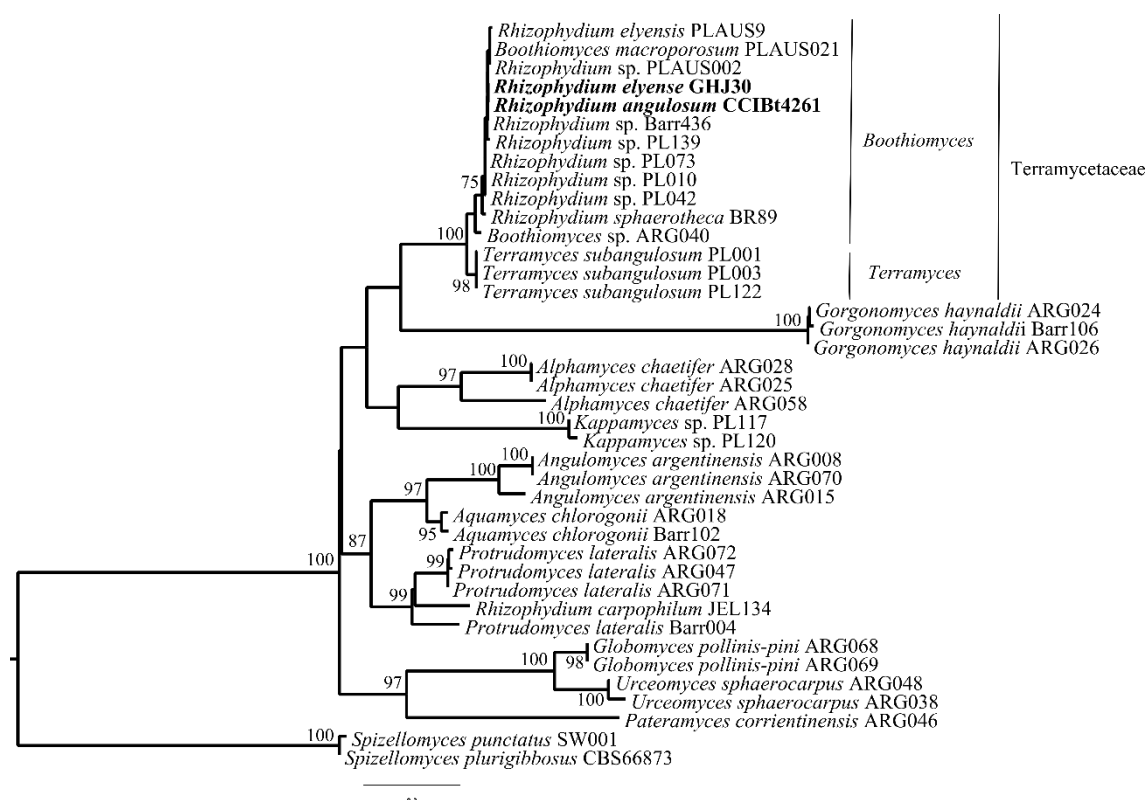
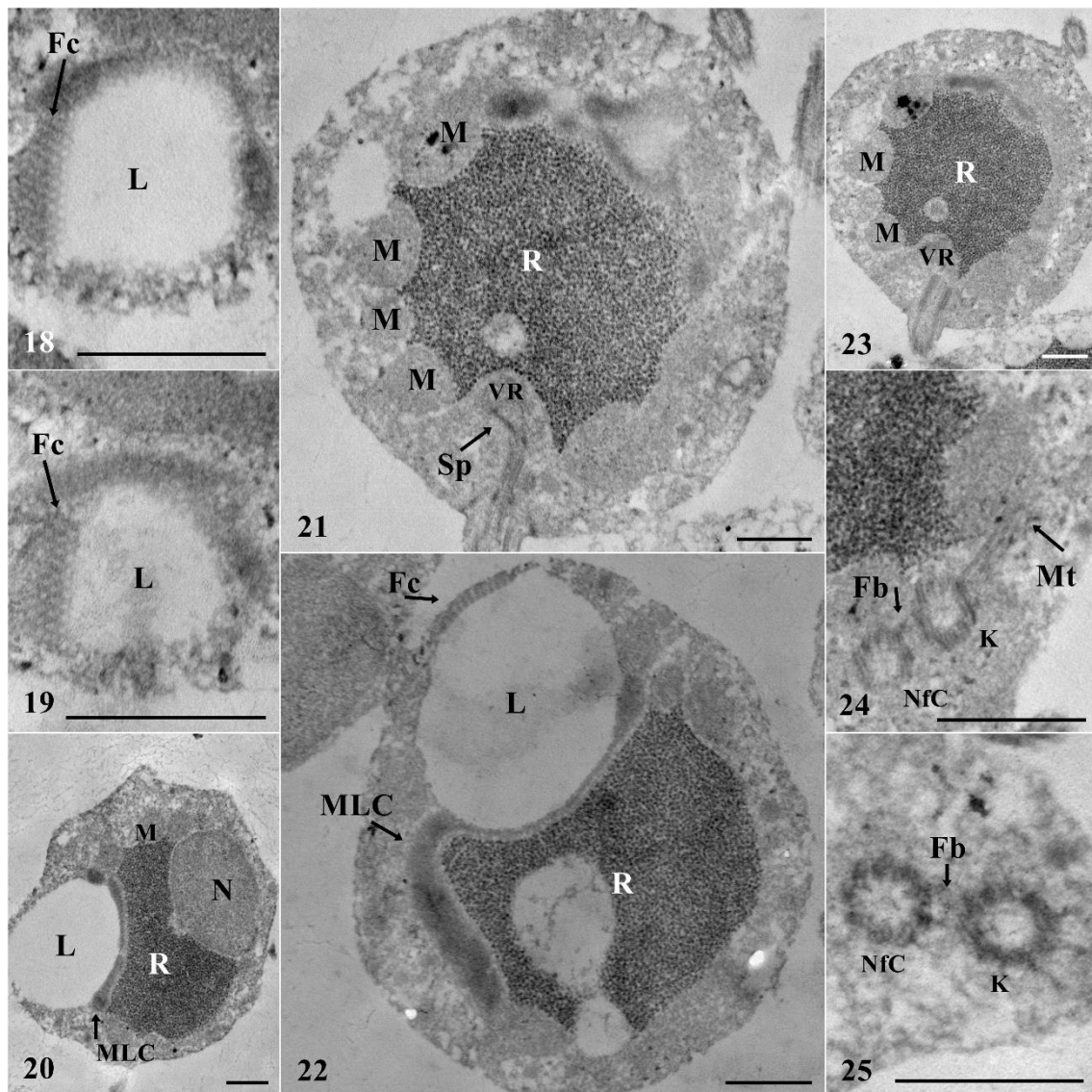


Figure 17. Combined topology (complete ITS and partial LSU regions of rDNA) of the maximum likelihood analysis. Our isolates are highlighted in bold and the numbers next to the branches represents the bootstrap values. Values below to 70% were not inserted in the three.

Transmission electronic microscopy analysis

Figs 18-25

We were able to observe in *R. angulosum* (CCIBt4261), all ultrastructural characters mentioned by Letcher *et al.* (2006) to *Boothiomycetes* representatives (Figs. 18-25). These characters include the presence of a fenestrated cisterna (**Fc**) partially covering the lipid globule (**L**) (Figs. 18, 19 and 22), a microbody lipid complex (**MLC**) associated to the mitochondria (**M**) (Fig. 20) and the shape of the structure associated to kinetosome (**KAS**) similar to a spur (**Sp**), which contain a spherical knob in the edge (Fig. 21). Besides that, we observed the presence of an evident vesicular region (**VR**) (Figs. 21 and 23) and microtubules, the later organized as a bundle (**Mt**) (Fig. 24). The presence of a fibrillar bridge (**Fb**) were also observed connecting the parallel kinetosome and non-flagellated centriole (Figs. 24 and 25).



Figures 18-25. Zoospore ultrastructure of *Rhizophydium angulosum*. 18-19. Transversal section of the lipid globule and fenestrated cisterna. 20, 21 and 23. Longitudinal section showing the nucleus position (partially inserted in ribosomal aggregation; mitochondria outside of ribosomal aggregation and associated to

microbody lipid globule; structure associated to kinetosome (KAS) like a spur containing a spherical knob in the edge. 22. Longitudinal section. 24. Longitudinal section showing the kinetosome and non-flagellated centriole linked by a fibrillary bridge and microtubules organized as a bundle. 25. Transversal section showing showing the kinetosome and non-flagellated centriole. **Fc**: fenestrate cisterna. **M**: mitochondria. **N**: nucleus. **R**: ribosomal aggregation. **Sp**: Spur. **L**: lipid globule. **MLC**: microbody lipid complex. **VR**: vesicular region. **Mt**: microtubules. **Fb**: fibrillar bridge. **NfC**: non-flagellated centriole. **K**: kinetosome. Scale bar: 200 nm

Taxonomy

Boothiomyces angulosum (Karling) Jerônimo & C.L.A. Pires-Zottarelli, comb. nov.

Figs.1-11

Basionym: *Rhizophydium angulosum* Karling

Type: As Karling (1968) did not designed any material as a type, we followed the recommendation of Letcher & Powell (2012), which suggested considering the original illustration (Fig. 1 M-X, Arch. Mikrobiol. 61: 115. 1968) as the lectotype of this species.

Zoosporangia angular and stellate in baits and clavate, subspherical or reniform on nutrient agar. Zoospores ultrastructural characters as described by Letcher *et al.* (2006) to *Boothiomyces* representatives, which include the presence of a vesicular region, fenestrate cisterna, microbody lipidic complex (MLC) related to mitochondria, structure associated to kinetosome (KAS) as a spur containing a spherical knob in the edge and kinetosome and non-flagellated centriole connected by a fibrillar bridge.

Diagnosis based on the isolate CCIBt4261 obtained from shrimp exoskeleton at sediment sample of the Itupararanga reservoir (23°36'53,10"S/47°23'34,70"W).

Specimen examined: Brazil, Sao Paulo, Ibiúna municipality, sediment sample from Itupararanga reservoir, 23°36'53,10"S - 47°23'34,70"W, shrimp exoskeleton.

Discussion

Morphology

Despite Letcher *et al.* (2006) consider *B. macroporosum* and *R. elyense* morphologically similar and potentially the same species, we were able to find fundamental differences to support our morphological identification of the strain GHJ30 as *R. elyense*. In *R. elyense* GHJ30, we were able to observe the production of sessile zoosporangia (Fig. 12 and 13) besides spherical resting spores with a granulated content (Fig. 16), corroborating the original description (Sparrow 1957), which were not cited by Karling (1968) or Letcher *et al.* (2006) to *B. macroporosum* isolates.

Differently from *Boothiomyces macroporosum* (Karling) Letcher, *R. angulosum* CCIBt4261 produced zoosporangia with a dilated region on the base (basal region) (Fig.

6). Besides that, this strain produced clavate (on nutrient agar) and stellate (on shrimp exoskeleton) zoosporangia, which were not cited to *B. macroporosum* or *R. elyense*. In addition, in *R. angulosum* CCIBt4261, the rhizoidal system is short and branched, while in *B. macroporosum* and *R. elyense* it is extensive.

Although these three taxa produce angular zoosporangia with prominent papillae, which morphologically characterize the Terramycetaceae representatives, only in *B. macroporosum* were observed the deliquescence of the dome-shaped papillae and formation of a hyaline protuberance in the exit orifice as illustrated by Karling (1968) in the figures 15, 16 and 17.

Phylogeny

Our concatenate analyses showed that *R. angulosum* CCIBt4261 belongs to *Boothiomyces* genus as well as *R. elyense* GHJ30, which are sister taxa. Although Letcher *et al.* (2006) consider *Boothiomyces* as a uni-specific genus and admit that *B. macroporosum* and *R. elyense* (PLAUS9) are probably the same species, the inclusion of one another species (*R. angulosum* CCIBt4261) within this clade, showed that it is a complex of species with a few interspecific variation based on ITS and LSU regions. Probably other regions of DNA besides other specimens are necessary to elucidate the relationship of the species in this clade. In addition, our sequence of *R. elyense* (GHJ30) presented enough phylogenetic distinctions if compared to *B. macroporosum* PLAUS21 and *R. elyense* PLAUS9, indicating that this species should also be transferred to *Boothiomyces* clade. However, as we did not performed the ultrastructural analyses of *R. elyense* (GHJ30), we decided not to transfer it herein.

Zoospore ultrastructure

The genera inserted in Terramycetaceae family, besides to produce angular zoosporangia, produce zoospores with a similar constellation of ultrastructural characters differing by the type of cisterna, which are fenestrate in *Boothiomyces* and simple in *Terramyces*. The structure associated to kinetosome (KAS) is a spur in both groups, but only in *Terramyces*, Letcher *et al.* (2006) observed the production of two spherical knobs in the edge of this structure.

The strain CCIBt4261 presented all ultrastructural characteristics described by Letcher *et al.* (2006) to *Boothiomyces* clade, including the fenestrate cisterna partially

covering the lipid globule and structure associated to kinetosome (KAS) as a spur, with one spherical knob in the edge.

Based on our morphological identification, phylogenetic reconstruction and zoospore ultrastructural analyses, we transferred *R. angulosum* to *Boothiomyces* genus as the new combination, *B. angulosum*, and pointed that *B. macroporosum* and *R. elyense* are morphologically distinctive, and the later should be transfer to *Boothiomyces*.

Acknowledgements

We would like to thank FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”) and CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”) for the PhD fellowships given to G.H. Jerônimo Alves, Fapesp Process N° 2014/16358-4 and CAPES. We are also grateful to FAPESP to support, through BEPE fellowships (“Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior” Process N° 2016/25800-8), the internship of G.H. Jerônimo Alves at Timothy James lab, in Michigan (USA), to perform the zoospores ultrastructural analyses. In addition, we are grateful to the University of Michigan, Department of Ecology and Evolutionary Biology and all Timothy James lab team, for the making me fell at home during the BEPE project period. Besides that, the thematic Acquased project (FAPESP Process N° 2009/53898-9) and productivity fellowship given to C.L.A. Pires Zottarelli (Process N° 304493/2015-5) by CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is acknowledged. To conclude, Lucas Michelotti, L., Denise C. Bicudo, Samantha B. Faustino, Elaine C.R. Bartozek, Stefano Zorzal de Almeida, Maria A.P.C. da Silva (Dorinha) are recognized for their contribution collecting samples or laboratory support besides “Instituto Florestal” and “Grupo Votorantim” for the permission given to collect samples.

References

- BARR, D. J. S. & HADLAND-HATMANN, V.E. (1978). Zoospore ultrastructure in the genus *Rhizophydium* (Chytrdiales). - *Canad. J. Bot.* **56**: 2380-2404.
- BARR, D. J. S. (1980). An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. - *Canad. J. Bot.* **58**: 2380-2394.
- BOYLE, D.G., HYATT, A.D., DASZAK, P., BERGER, L., LONGCORE, J.E., PORTER, D., HENGSTBERGER, S.G. & OLSEN, V. (2003). Cryo-archiving of *Batrochochytrium dendrobatidis* and other Chytridiomycetes. - *Dis. Aqua. Organ.* **56**: 59-64.
- GUINDON S. & GASCUEL, O. (2003). PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. - *Syst. Biol.* **52**: 696-704.
- 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. (1968). Zoosporic fungi of Oceania. - *Arch. Mikrobiol.* **61**: 112-127.
- KARLING, J. S. (1977). Chytridiomycetarum Iconographia. - J. Cramer, Vaduz
- KAZUTAKA, K. & DARON, M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Available from: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server> (accessed 27 April 2018).
- LEPELLETIER, F., KARPOV, S.A., ALACID, E., LE PANSE, S., BIGEARD, E., GARCÉS, E., JEANTHON, C. & GUILLOU, L. (2014). *Dinomyces arenensis* gen. et. sp. nov. (Rhizophydiales, Dinomycetaceae fam. nov.) a chytrid infecting marine dinoflagellates. - *Protist* **165**: 230-244.
- LETCHER, P. & POWELL, M.J. (2005). *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* **80**: 115-133.
- LETCHER, P., POWELL, M.J., CHURCHILL, P.F. & CHAMBER, J.G. (2006). Ultrastructural and molecular deliniation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). – *Mycol. Res.* **110**: 898-915.

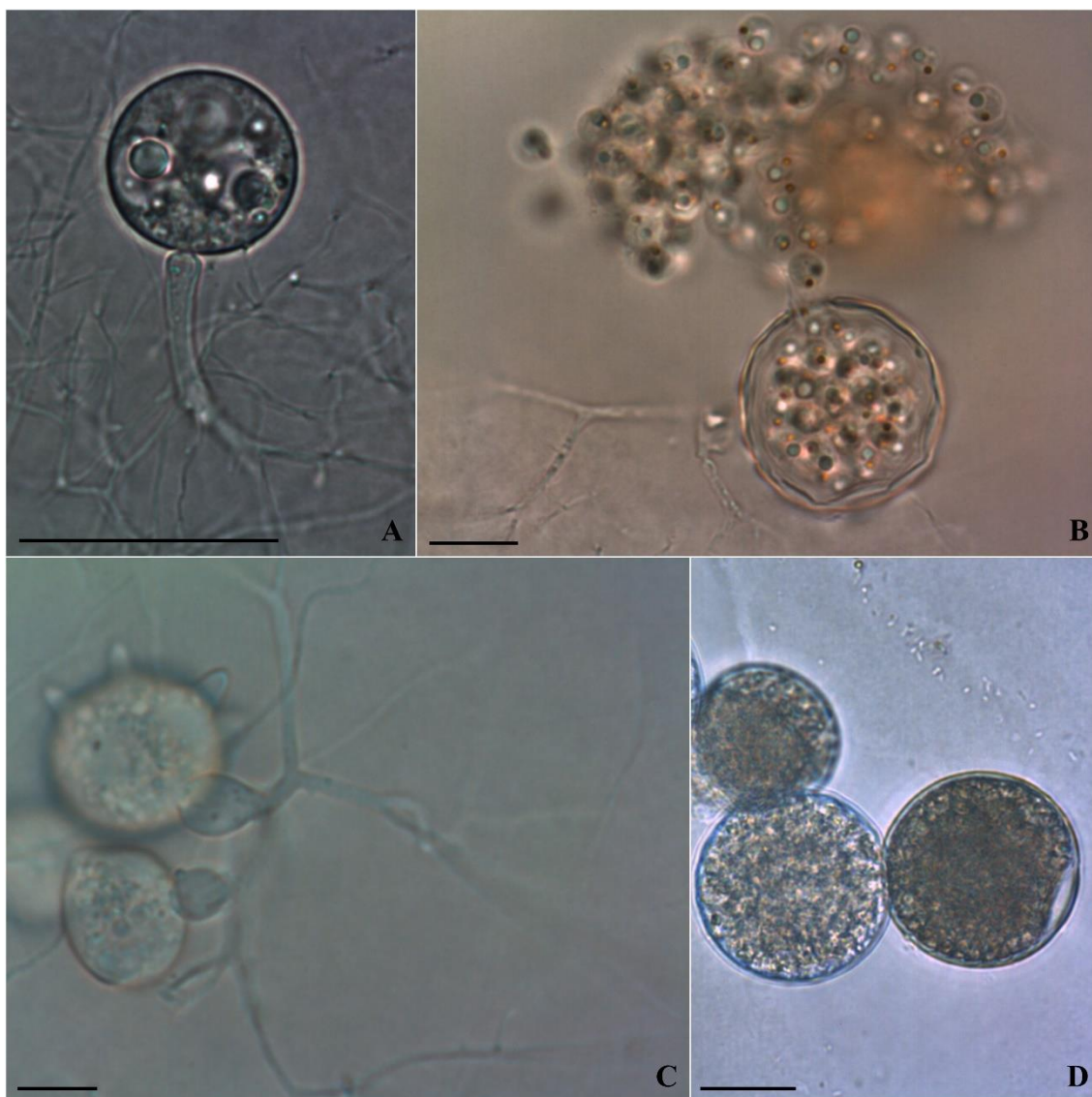
- LETCHER, P.M. VELEZ, C.G., BARRANTES, M.E., POWELL, M.J., CHURCHILL, P.A. & WAKEFIELD, W.S. (2008a). Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. – *Mycol. Res.* **112**: 759-782.
- LETCHER, P., POWELL, M.J. & VIUSENT, M.C. (2008b). Rediscovering of an unusual chytridiaceous fungus new to the order Rhizophydiales. - *Mycologia* **100**: 325-334.
- LETCHER & POWELL, M. (2012). A taxonomic summary and revision of *Rhizophydium* (Rhizophydiales, Chytridiomycota). University Printing, University of Alabama, Tuscaloosa, 222 p.
- LETCHER, P., POWELL, M.J. & DAVIS, W.J. (2015). A new family and four new genera in Rhizophydiales (Chytridiomycota). - *Mycologia* **107**: 808-830.
- POSADA, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. - *Mol. Biol. Evol.* **2**: 1253–1256.
- POWELL, M.J. LETCHER, P.M. & LONGCORE, J.E. (2011). Operculomyces is a new genus in the order Rhizophydiales. - *Mycologia* **102**: 854-862.
- SPARROW, F.K. (1957). A further contribution to the phycomycete flora of Great Britain. – *Trans. Br. Mycol. Soc.* **40**: 523-535.
- SPARROW, F.K. (1960). Aquatic Phycomycetes. 2nd revised ed. - University of Michigan Press, Ann Arbor.
- VAIDYA, G., LOHMAN, D.J. & MEIER, R. (2010). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. - *Cladistics* **27**: 171–180.
- VILGALYS, R. & HESTER, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. – *J. Bacteriol.* **172**: 4238-4246.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Part Three: Genetics and Evolution. Academic Press (ed.). pp. 315-322.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

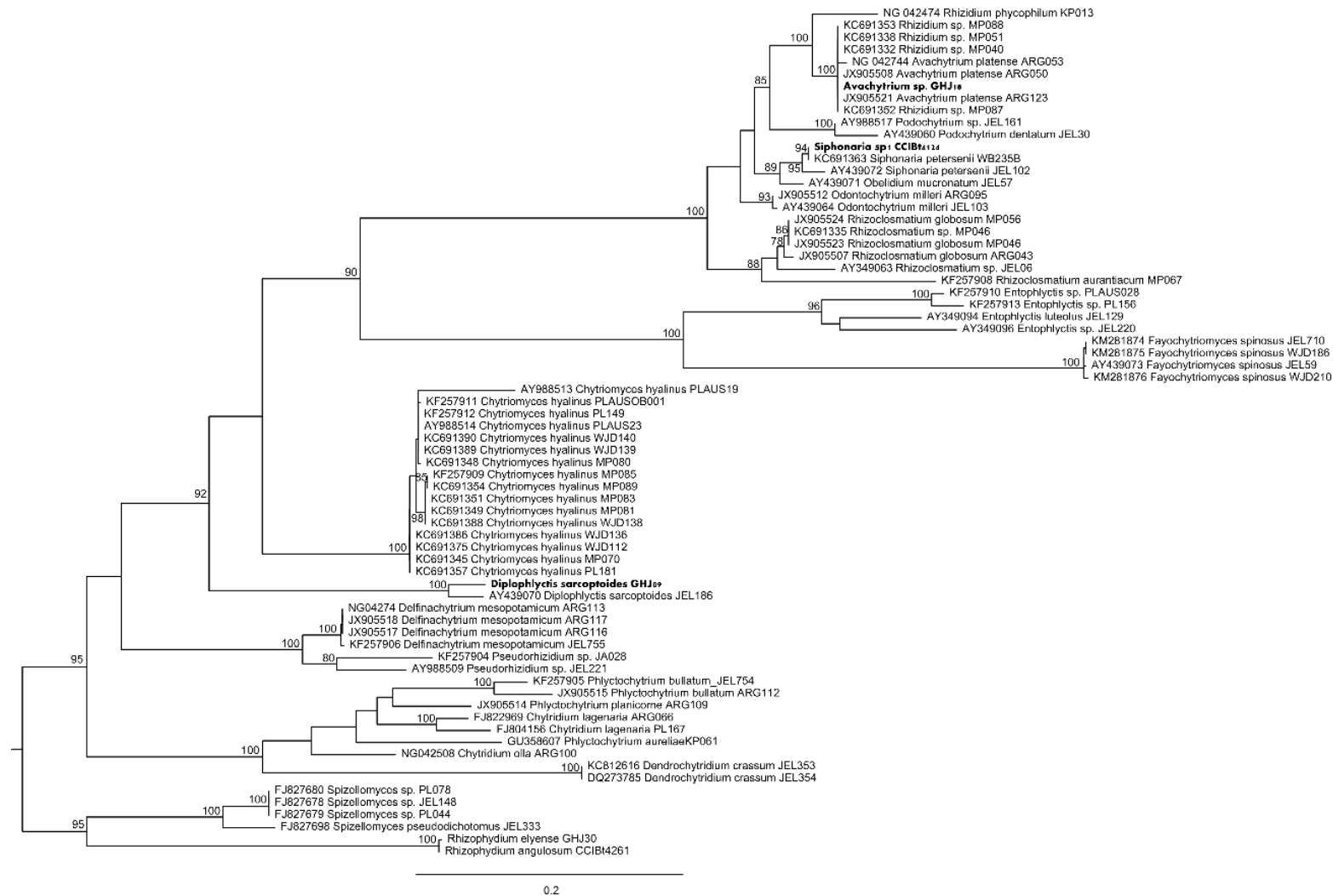
O estudo desenvolvido evidência a importância de estudos taxonômicos e ecológicos em ecossistemas pouco explorados, como é o caso dos reservatórios. Em especial, o estudo do sedimento superficial, compartimento até então ignorado com relação à diversidade destes organismos no Brasil, apresentou resultados muito significativos. Neste compartimento, foi descrita uma nova espécie de *Nowakowskiella* (*Nowakowskiella crenulata*), bem como observada pela primeira vez para no Brasil a espécie *Plectospora gemmifera*. Além disso, maior parte da riqueza de espécies dos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota foi observada neste compartimento. Como durante as amostragens foi observada maior frequência, abundância e riqueza de táxons de fungos zoospóricos no sedimento superficial e dos oomicetos na coluna d'água, podemos rejeitar a hipótese de que estes dois grupos ocorreriam preferencialmente na coluna d'água. Os poucos relatos de fungos zoospóricos em amostras de sedimento podem estar mais relacionados às limitações de amostragem, do que necessariamente aos padrões ecológicos destes fungos.

Os organismos zoospóricos apresentaram uma ampla distribuição ao longo de diferentes gradientes tróficos, assim como mencionado por Rocha (2004), estando algumas espécies relacionadas aos locais com as mais altas concentrações de nitrogênio e fósforo total, como *Catenophlyctis variabilis*, enquanto outras à locais com as mais baixas concentrações destes nutrientes (*Diplophlyctis sarcoptoides* e *Cladochytrium replicatum*), e que poderiam potencialmente ser táxons indicativos da qualidade das águas. Concluímos, portanto, que os organismos zoospóricos heterotróficos são, no geral, tolerantes às amplas variações nas concentrações de nitrogênio e fósforo, mas alguns táxons são limitados pela disponibilidade destes nutrientes, particularmente o fósforo.

Com isso, consideramos que os ecossistemas lênticos representam ambientes ricos em diversidade de organismos zoospóricos e que merecem maior atenção, em especial o estudo de suas camadas sedimentares e as relações de ocorrência, frequência e abundância destes organismos frente aos padrões ambientais, os quais ainda são enormemente negligenciados em termos mundiais.

Anexo I

Zoosporângios de *Siphonaria* sp.1 (A-B), *Diplophlyctis sarcoptoides* (C) e *Avachytrium* sp.1 (D) em meio de cultura PmTG. Barras = 10 μ m.



Análise concatenada de Máxima Verossimilhança das regiões SSU e LSU do rDNA. Os isolados obtidos durante este estudo estão destacados em negrito. Os números próximos aos ramos representam os valores de “bootstratp”, para os quais foram incluídos na topologia somente os valores acima de 75%.

**New insights into *Plectospora* genus (Oomycetes, Straminipila): morphological and molecular analyses**GUSTAVO HENRIQUE JERÔNIMO^{1,2}, ANA L. JESUS¹, SARAH C.O. ROCHA¹, DANILO R. GONÇALVES & CARMEN L.A. PIRES-ZOTTARELLI¹¹ Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, 3687 Miguel Stéfano Ave., 04301-902, São Paulo, SP, Brazil² E-mail: gejeronimo@hotmail.com**Abstract**

We analyzed the morphology and phylogenetic placement of three isolates of *Plectospora* belonging to *Plectospora gemmifera* and *P. myriandra* that were isolated from soil, water bodies and reservoir sediment. The molecular data are from the partial large subunit and the complete internal transcribed regions of the ribosomal DNA. The genus is characterized by the presence of lobulated zoosporangia and mode of zoospore discharge forming an evanescent cluster in the exit orifice. Our isolates clustered together with the single isolate of the genus available in GenBank, however, our phylogenetic analysis and morphological characterization showed that the isolate identified as *Plectospora myriandra* CBS 523.87 is possibly another taxon. In addition, *P. gemmifera* is recorded for the first time in Brazil and its sequences were inserted for the first time in a phylogenetic reconstruction.

Keywords: morphology, phylogeny, *Plectospora***Introduction**

The genus *Plectospora* was proposed by Drechsler (1927) to include *Plectospora myriandra*, a phytopathogenic species originally isolated from sugarcane roots in USA. Initially placed in Saprolegniaceae due its morphological characteristics, the genus was transferred to Leptolegniaceae by Dick *et al.* (1999) and more recently to Verrucalvaceae by Beakes *et al.* (2014) considering its phylogenetic position together with the genera *Aphanomyces*, *Pachymetra* and *Verrucalvus*. The genus present mycelial growth and a type of zoosporangium composed typically of a complex of inflated elements together with well-developed evacuation hyphae (Drechsler 1927).

Currently, according to MycoBank, four phytopathogenic species of *Plectospora* are described and considered legitimate (*Plectospora myriandra* Drechsler, *P. gemmifera* Drechsler, *P. agama* Drechsler and *P. plagiocaula* Drechsler) since *Plectospora dubia* Atkins was transferred to *Atkinsiella* by Vishiniac (1958) considering the morphological characteristics.

The species of *Plectospora* are responsible for causing diseases in crops of economic importance such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.) (Drechsler 1927) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and also in higher-plants such as *Prunella vulgaris* L. and *Rumex acetosella* L. (Watanabe 1987), although its infectious mechanism remains poorly investigated. Considering the importance of *Plectospora* species as parasite of different crops, is surprising as mentioned by Johnson *et al.* (2002), that only few studies have reported the occurrence of the genus worldwide. After their original descriptions, only *P. myriandra* were reported again in literature, firstly in Japan (Watanabe 1987) and then in Brazil (Gomes *et al.* 2003, Rocha 2006, Miranda & Pires-Zottarelli 2012, Jesus *et al.* 2013), but always as saprotrophs in vegetal debris. On the other hand, there is no record of *P. gemmifera* and the other species in literature after their publication. According to Johnson *et al.* (2002), the few reports can be related to a frequent misidentification of the species as belonging to *Aphanomyces*, another genus from Verrucalvaceae that presents morphological similarities and is composed by species considered parasites of plants (Scott 1961, Gaulin *et al.* 2007).

The aim of this study was to characterize morphologically the isolates of *P. myriandra* and *P. gemmifera* and include both species in a phylogenetic reconstruction.

Material & Methods

Origin of isolates

We used three Brazilian isolates of *Plectospora* in our analysis, which were deposited in CCIBt culture collection (“Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica”, São Paulo, SP, Brazil) and MMBF culture collection (“Micoteca Mário Barreto Figueiredo”) belonging to WFCC (World Federation for Culture Collections). The isolates CCIBt 3992 and CCIBt 3372 of *Plectospora myriandra* was isolated from soil (23°03'05''–25°18'18''S and 47°53'48''–48°05'42''W) and freshwater samples (23°38'08''–23°40'18''S and 46°36'48''–46°38'00''W) respectively, of the Atlantic Rainforest areas, São Paulo State, Brazil. The isolate of *Plectospora gemmifera* (CCIBt 4250, MMBF 04/16) was isolated from sediment sample of Itupararanga reservoir (23°37'11.58''S and 47°13'59.34''W).

Morphological studies

Sexual and asexual structures of the isolates were characterized and measured once the pure cultures were obtained. Identification was made according to the main literatures of the genus including Drechsler (1927, 1929) and Johnson *et al.* (2002). Due to the similarity of the species of the genus, a comparative table has been prepared to help in the morphological identification of these two species. The morphological description of *P. myriandra* was made considering the isolates CCIBt 3992 and CCIBt 3372, the latter described in Jesus *et al.* (2013).

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

For DNA extraction, the isolates were cultivated initially onto solid medium with 0.20 gL⁻¹ of each streptomycin sulphate and penicillin G, as antibiotics. A small piece of agar with mycelium from the pure culture was transferred to Erlenmeyer's containing 50 mL of MP₅ liquid medium (maltose-peptone) prepared with autoclaved reverse-osmosis water. After incubation for 5–10 days at 21°C, the mycelium was transferred to 2.0 mL microfuge tubes in order to obtain mycelial pellets with enough biomass for DNA extraction. DNA genomic extraction followed the protocol described in the “PureLink Genomic DNA Kit” (InvitrogenTM). Electrophoresis was performed using 1% (p/v) agarose gel. The partial LSU and complete ITS regions were amplified using the primers LR0R/LR6-O (Riethmüller *et al.* 2002) and UN-up 18S42/UN-up 28S22 (Robideau *et al.* 2011) respectively. DNA was amplified with the PCR SuperMix kit (Invitrogen®) for a final volume of 25 µl in a C1000 TouchTM Thermal Cycler Bio-Rad. The PCR amplification technique was performed following the conditions described by Marano *et al.* (2014). Amplicons were purified with AxyPrep PCR Clean-up kit (Axygen®).

Phylogenetic analysis

For phylogenetic reconstruction were selected 23 isolates of Verruculaceae, which represents the genera with sequences available in GenBank (Table 1). The isolates *Achlya primoachlya* (Coker & Couch) T.W. Johnson & R.L. Seymour (CCIBt 3982) and *Achlya caroliniana* Coker (CCIBt 3870) were used as the outgroup taxa. Initially, the contiguous sequences were assembled using SequencherTM version 4.1.4 (Gene Codes®) and the ambiguous bases were manually edited. The alignment was performed in MAFFT version 7 (Kazutaka & Daron 2013) following standart default. JModelTest 0.1.1 (Posada 2008), with Akaike Information Criterion, was used to determine the best model of base substitution. For sequences of ITS and LSU of rDNA regions the Transversion model (TVM+G) plus gamma distribution (G) was indicated as the best substitution model. The complete ITS (763 bp) and partial LSU regions (1261 bp) were concatenated in SequenceMatrix 1.8 (Vaidya *et al.* 2010) resulting in a fragment of 2024 bp in length. The Maximum likelihood (ML) analysis were performed in Garli 2.01 (Bazinnet & Cummings 2008) using partition models and branch swapping by best TBR, while the support of nodes, was determined with bootstrap analysis with 1000 replications. Tree was rooted with members of the *Achlya* Nees.

TABLE 1. Taxa, voucher, GenBank accession number of the isolates used in phylogenetic reconstruction. NA: not available.
* Isolates from this study.

Taxa	Voucher	GenBank accession number	
		ITS	LSU
<i>Aphanomyces repetans</i>	CBS 1268.86	NA	HQ395662
<i>Aphanomyces repetans</i>	CBS 1268.87	NA	HQ395671
<i>Aphanomyces laevis</i>	CBS 478.71	HQ643122	HQ665242
<i>Aphanomyces laevis</i>	CCIBt 4070	KP006463	KP006453

Taxa	Voucher	GenBank accession number	
		ITS	LSU
<i>Aphanomyces sinensis</i>	ATCC 4825	JQ070116	JQ070142
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt 3994	KP006462	KP006454
<i>Aphanomyces stellatus</i>	AR 51	NA	AF119587
<i>Aphanomyces salsuginosus</i>	ATCC 4775	JQ070107	JQ070132
<i>Aphanomyces astaci</i>	CBS 1215.37	NA	JX115216
<i>Aphanomyces iridis</i>	SAP 356	FM999227	NA
<i>Aphanomyces iridis</i>	CBS 524.87	HQ643121	HQ665248
<i>Aphanomyces euteiches</i>	CBS 154.73	NA	HQ665129
<i>Aphanomyces euteiches</i>	315	KM486065	NA
<i>Aphanomyces euteiches</i>	1309	KM486066	NA
<i>Aphanomyces euteiches</i>	CBS 156.73	NA	HQ665132
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	CBS 477.71	HQ643115	HQ665241
<i>Pachymetra chaunorhiza</i>	CBS 960.87	NA	AF119598
<i>Plectospora myriandra</i> *	CCIBt 3992	KR063220	KR063219
<i>Plectospora myriandra</i> *	CCIBt 3372	KT935288	KX353796
<i>Plectospora myriandra</i>	CBS 523.87	HQ643402	HQ665247
<i>Plectospora gemmifera</i> *	CCIBt 4250	KX084705	KX084707
<i>Achlya primoachlya</i>	CCIBt 3982	KM058757	KM058754
<i>Achlya caroliniana</i>	CCIBt 3870	KP006458	KP006451

Results

Plectospora gemmifera and *P. myriandra* had common characteristics of the genus such as the presence of lobulate zoosporangia and mode of zoospore discharge forming an evanescent cluster in exit orifice (Fig. 1–2). Although these species are morphologically similar, some structures can be used to help in distinguishing them (Table 2). *Plectospora myriandra* presents an evident pellucid spot and scattered pits in the internal wall of the oospores (Fig. 2) while *P. gemmifera* produces abundant gemmae in the whole life cycle (Fig. 1). Besides that, our isolates presented proportion of antheridia production different that was described by Drechsler (1927, 1929). We observed that our isolates of *P. myriandra* frequently present abundant antheridia while in *P. gemmifera* they are rare or not frequent. Therefore, we advise that antheridia proportion should be carefully observed in future taxonomic studies. This is the second record of *P. gemmifera* in the world and the first record in Brazil.

Morphological analysis

Plectospora gemmifera Drechsler (1929: 358)

Fig 1. A–M

Mycelium dense; hyphae slender, sparingly branched. Inflated elements of sporangia abundant, sometimes very extensive, which produces a long tube to release the zoospores. Zoospores forming an evanescent cluster in exit orifice and encysting with usually 10–12 µm diam. Gemmae abundant, spherical, 20–35 µm diam. and frequently pyriform or obpyriform, 40–35 × 25–28 µm diam. Oogonia mostly terminal on short branches or on longer hyphae, smooth, subsphaerical, 18–22 × 19–24 µm diam., spherical, 20–30 µm diam. provided with wall 2.5–3.0 µm in thickness. Antheridia absent or when present, diclinous. Oospore single, colorless, subcentric, spherical, 15–20 µm diam. and subsphaerical, 18–20 × 20–22 µm diam.

Specimen examined—BRAZIL. São Paulo: Votorantim, Itupararanga reservoir, from sample of surface sediment located 2 meters under the water column, 29 august 2012, CCIBt 4250 and MMBF 04/16.

Notes: The isolate CCIBt 4250 produces abundant gemmae of different formats when cultivated in culture medium (CMA + glucose) and in water cultures growing in *Sorghum* sp. seeds. In contrast with the original description of Drechsler (1929), that observed antheridia always present, in the isolate studied the antheridia production were rare or not frequent and most oogonia are abortive and/or parthenogenetic. Despite this, the abundant production of gemmae and the characteristics of oogonium, oospores and zoosporangium are in agreement with Drechsler (1929) and confirm our identification as *Plectospora gemmifera*.

TABLE 2. Comparison of morphological characteristics between isolates of *Plectospira myriandra* and *P. gemmifera* collected during this study.

Structures	Taxa (number of the culture collection)	
	<i>Plectospira myriandra</i> (CCIBt 3772/CCIBt 3992)	<i>Plectospira gemmifera</i> (CCIBt 4250)
Antheridia	diclinous, monoclinal, frequent	diclinous, rare
Oogonium	scattered pits in the wall	unpitted wall
Oospores	presence of pellucid spot	absence of pellucid spot
Gemmae	absent	present

Notes: Johnson *et al.* (2002) mentioned that *P. gemmifera* presents zoosporangia larger and with more lobules than *P. myriandra*, however, we did not include this characteristic in the table above once it varies depending on the bait used and thus it is difficult to observe and compare.

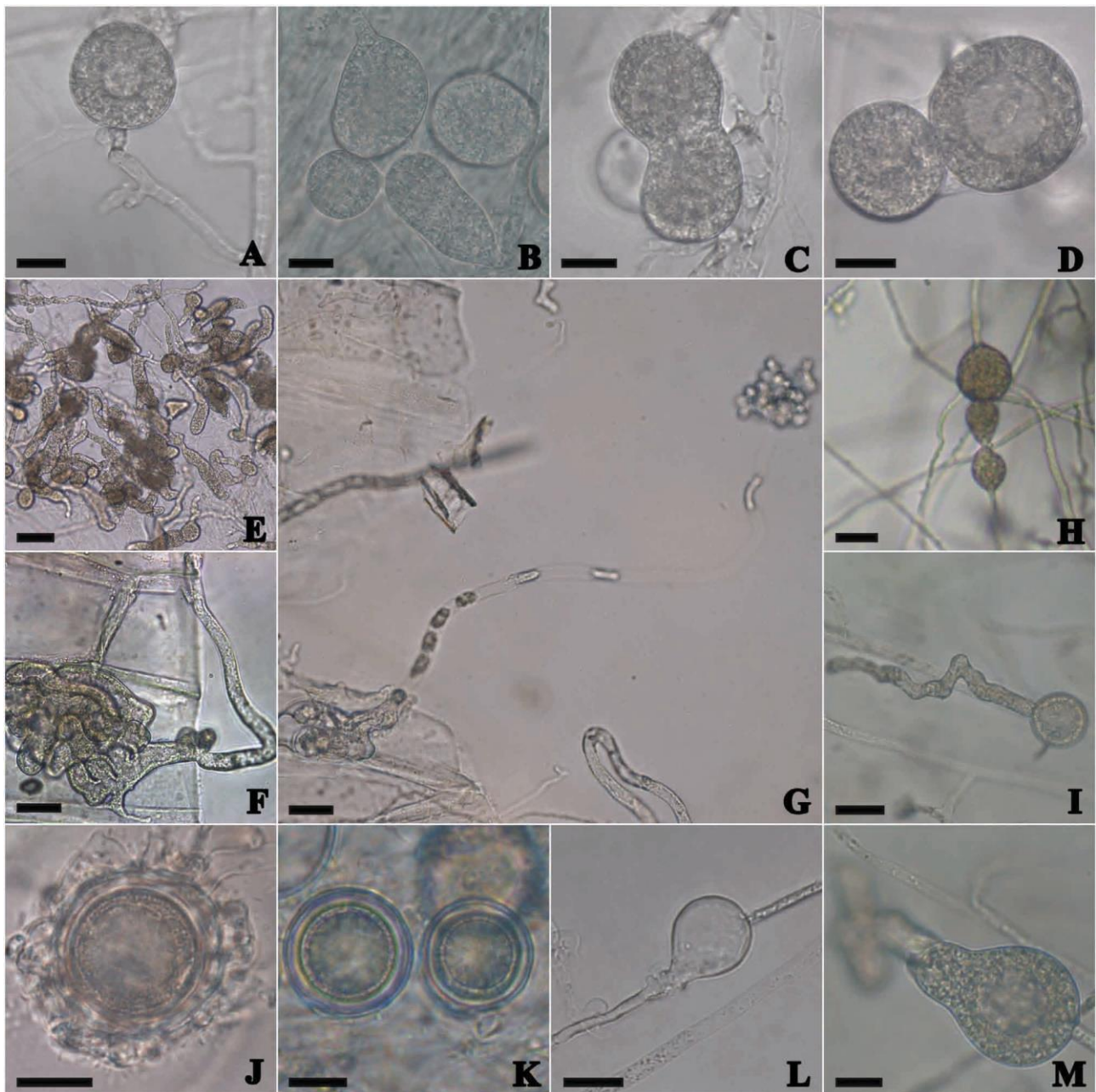


FIGURE 1. A–M. *Plectospira gemmifera* CCIBt 4250. A–D. Different formats of gemmae. E. Lobulated zoosporangia. F–G. Zoosporangium with a long tube and zoospores cluster. H. Catenulate gemmae. I. Spherical gemmae with germinative tube. J. Oogonium and antheridia. K. Subcentric oospores. L. Empty gemmae. M. Piriform gemmae germinating. Bars: 10 μ m.

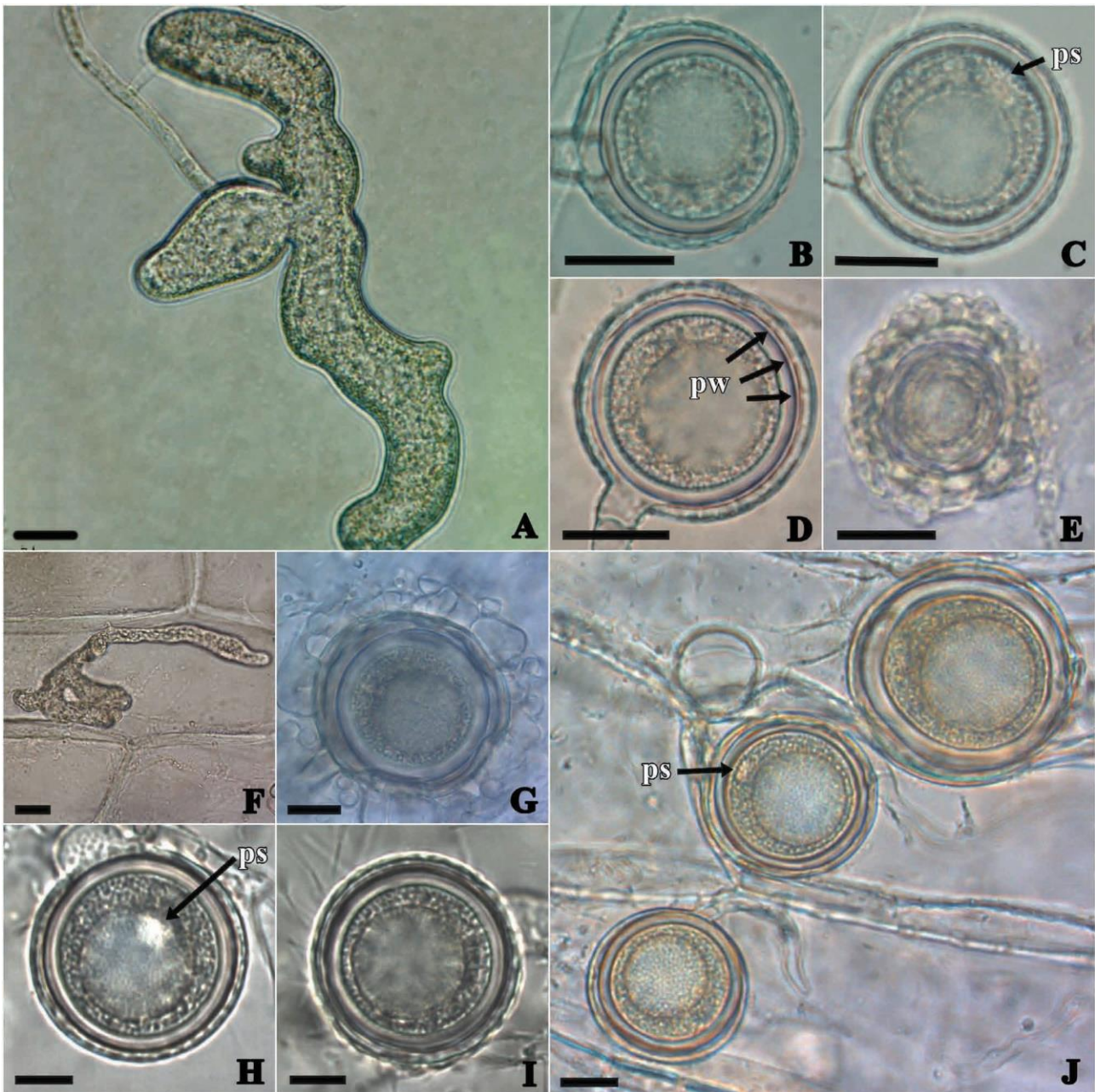


FIGURE 2. A–J. *Plectospira myriandra*. A–E. *Plectospira myriandra* CCIBt 3992. A. Lobulated zoosporangium. B. Oogonium and subcentric oospore. C. Oogonium showing pellucid spot (ps). D. Oogonium showing scattered pits in the wall (pw). E. Oogonium and abundant antheridia. F–J. *Plectospira myriandra* CCIBt 3372. F. Lobulated zoosporangium. G. Oogonium and antheridia. H. Oogonium and pellucid spot (ps) showed in indirect focus (arrow). I. Oogonium and subcentric oospore. J. Oogonia with pellucid spot indicated by the arrow. ps: pellucid spot. pw: scattered pits in the wall. Bars: 10 µm.

***Plectospira myriandra* Drechsler (1927: 294)**

Fig 2. A–J

Mycelium dense; hyphae slender, sparingly branched. Inflated elements of sporangia abundant, which produces a long tube to release the zoospores. Zoospores forming an evanescent cluster in exit orifice and encysting with usually 8–11 µm diam. Gemmae absent. Oogonia mostly laterally, rarely terminal on short branches, smooth, spherical, 20–30 µm diam., provided with wall of 1.0–2.0 µm in thickness. Antheridia always present, diclinous, rarely monoclinal, ranging from 2 to 15 or more. Oospore single, yellow, subcentric, spherical, 13.7–22 µm in diam.

Specimen examined:—BRAZIL. São Paulo: Cananéia, “Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)”, from soil sample, 20 August 2012, CCIBt 3992.

Notes:—The isolates CCIBt 3992 and CCIBt 3372 (Jesus *et al.* 2013) of *Plectospora myriandra* presented all characteristics mentioned in its original descriptions (Drechsler 1927), and are in agreement with other three studies previously published in Brazil (Rocha 2006, Gomes *et al.* 2003, Miranda & Pires-Zottarelli 2012). In addition, the features mentioned above, which are shown in Table 2 and Figure 2, were crucial for a correct identification of this species.

Phylogenetic placement

Our concatenate analysis showed two major clades (Fig. 3) which presented the same configuration of the functional groups mentioned by Diéguez-Urbeondo *et al.* (2009). The clade I is composed by saprophytic and/or opportunistic taxa (subclade I-a) and by species considered parasites of animals (subclade I-b). The clade II is composed by parasites of plants, and is divided in two subclades (II-a and II-b) strongly supported (100% and 100%, respectively). The subclade II-b is composed by four isolates of *Plectospora* genus (*P. myriandra* CCIBt 3372, CCIBt 3992, CBS 523.87 and *P. gemmifera* CCIBt 4250) and can be considered as sister group of the *Aphanomyces* and *Pachymetra* species parasites of plants (clade II-a). Besides that, our phylogenetic reconstruction indicated with high bootstrap value (100%) that the isolate of *P. myriandra* CBS 523.87 possibly do not belong to this taxon.

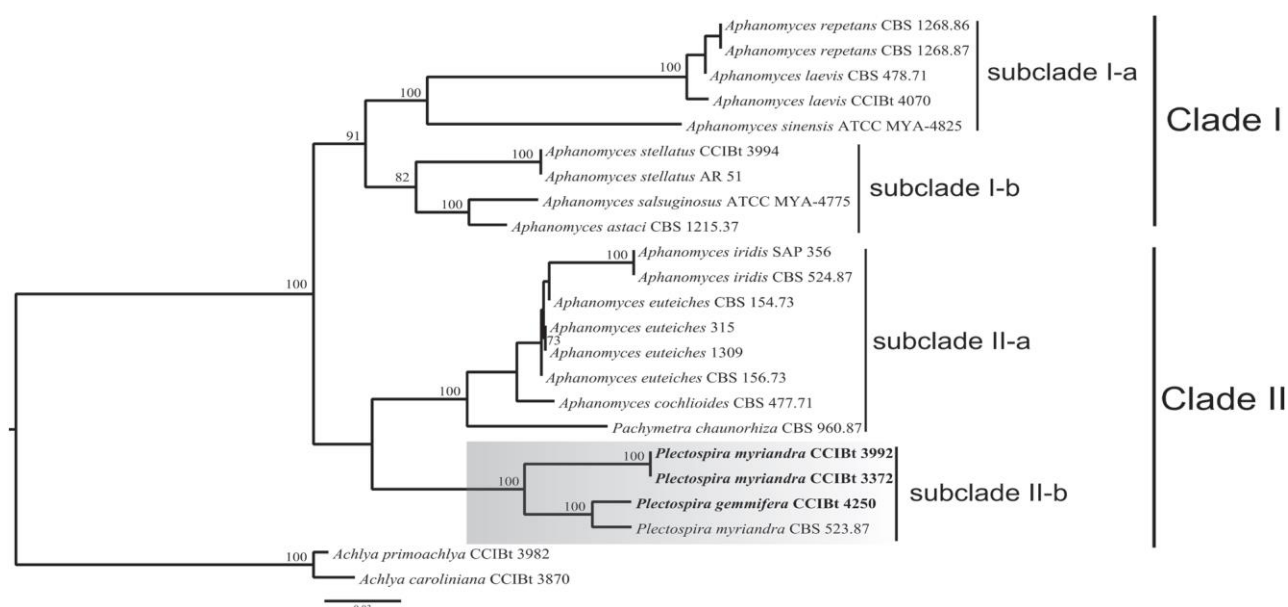


FIGURE 3. Concatenate analysis of complete ITS and partial LSU rDNA regions of Verruculvaceae family inferred by Maximum Likelihood method. The numbers next the branches indicate the bootstrap values (%) and the scale bar the numbers of substitution per site. In bold the three Brazilian isolates of *Plectospora* and in grey the whole clade.

Discussion

Our morphological and phylogenetic analyses added important contributions to a poorly investigated genus inside the Verruculvaceae *sensu* Beakes *et al.* (2014). Both species (*P. gemmifera* and *P. myriandra*) analyzed in this study showed morphological features that contributed to their identification. In addition, their position in the phylogenetic analysis of two DNA combined regions (complete ITS and partial LSU of rDNA) corroborated our morphological characterization.

The *Plectospora* species formed a well-supported monophyletic subclade (100%) positioned as a sister group of subclade II-a, composed by parasites of plants (Riethmüller *et al.* 2002, Diéguez-Urbeondo *et al.* 2009). Although the phylogenetic analysis showed a closely relation between the isolates from this study with plant pathogenic

species (subclade II-a), it is interesting to mention that our isolates were isolated as saprophytes from soil, freshwater and surface sediment of reservoirs, which shows the great adaptability of these species in different environments.

Inside the genus *Plectospora*, the three isolates from this study clustered with the single isolate of the genus identified as *P. myriandra* (CBS 523.87) available in GenBank, although our two isolates of *P. myriandra* are not very closely related with the specimen from GenBank. Considering the position of *P. myriandra* from GenBank together with *P. gemmifera* with high support value (100%), as well as the presence in our *P. myriandra* isolates of singular characteristics mentioned in Table 2, we suggest that *P. myriandra* (CBS 523.87) described by Watanabe (1987) is possibly another species of *Plectospora*.

This study brings important information about the occurrence and provides new molecular data of a poorly studied genus. Although both species herein related have been previously described as parasites of plants, we found them acting as saprophytes in soil, freshwater habitats and sediment reservoir. The ability of both species as facultative parasites shows the great flexibility of these taxa to different environmental pressures.

Acknowledgments

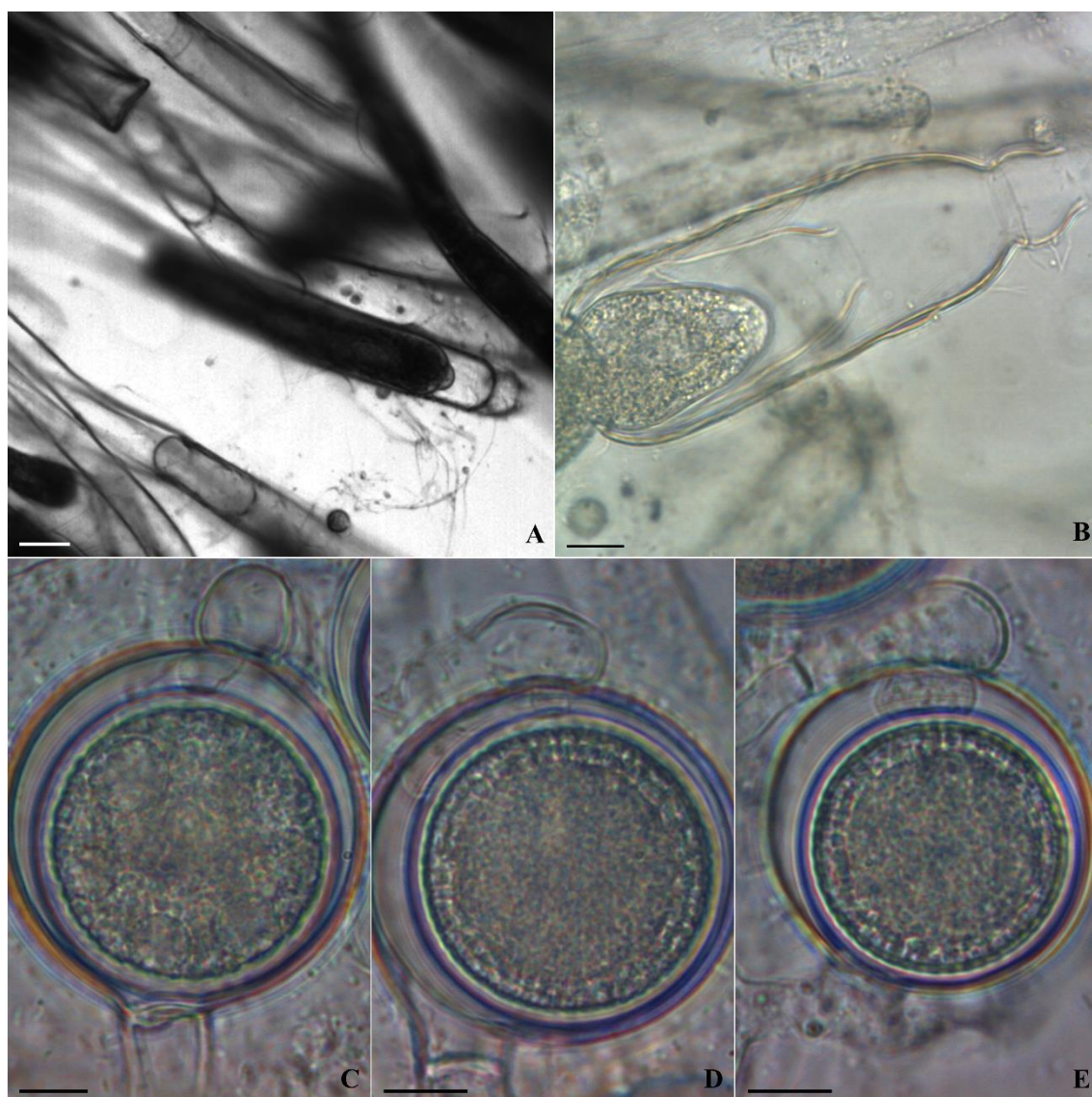
We would like to thank FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”), for the fellowships given to G.H. Jerônimo (Process N° 2014/16358-4) and for financial support given to C.L.A. Pires Zottarelli (Process N° 2012/50222-7) and to thematic project Acquased (Process N° 2009/53898-9). Also CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is acknowledged for the fellowship to S.C.O. Rocha (Process N° 117238/2012-0) and C.L.A. Pires Zottarelli (Process N° 304493/2015-5). In addition, D.C. Bicudo, S.B. Faustino, E.C.R. Bartozek, S. Zorzal de Almeida, M.A.P.C. da Silva (Dorinha) are recognized for their contribution in collecting samples and in laboratory analysis. To conclude I would like to thank “Instituto Florestal” and “Grupo Votorantim” for the permission given to collect samples.

References

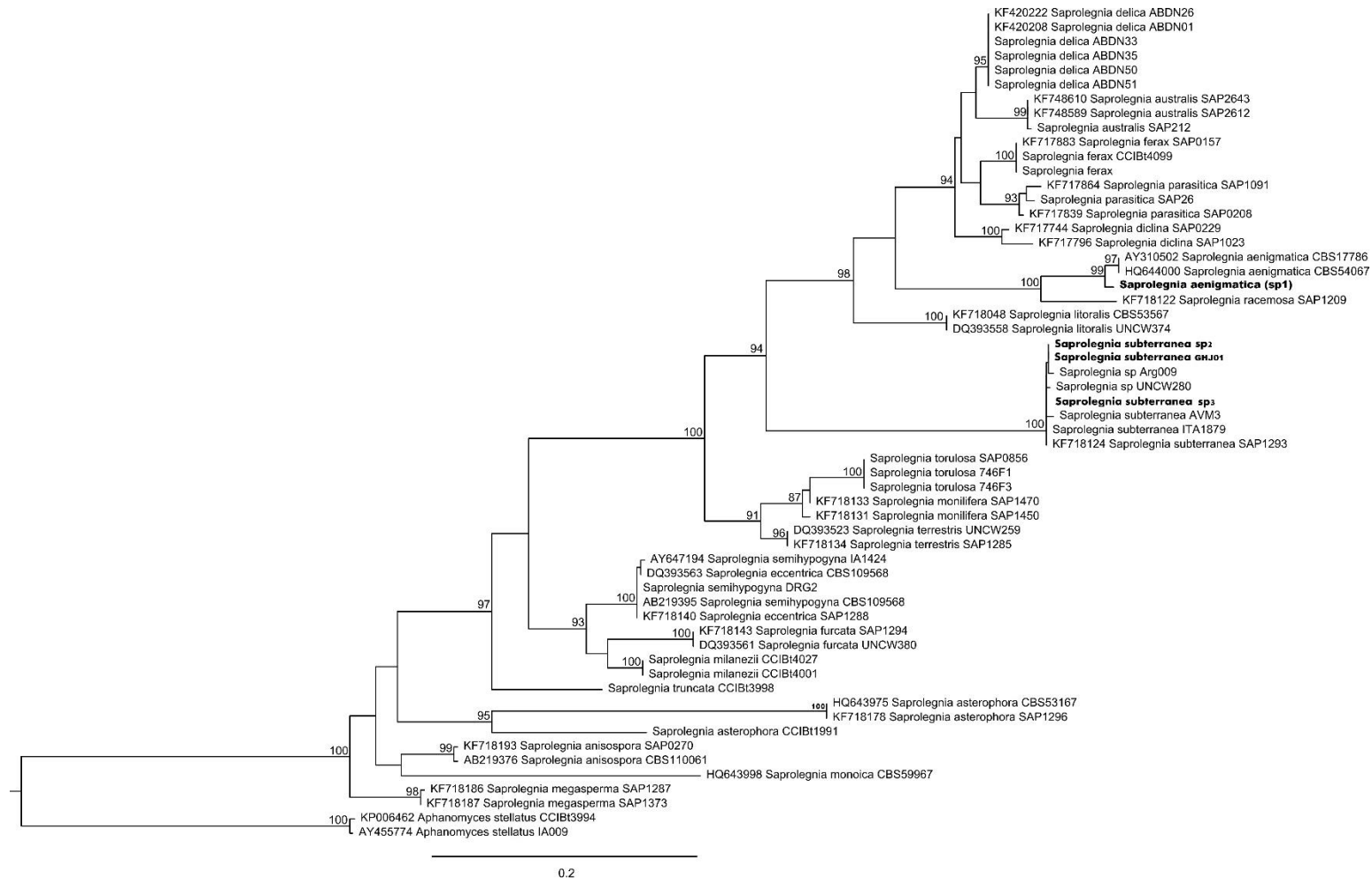
- Bazinet, A.L., & Cummings, M.P. (2008) The Lattice Project: a grid research and production environment combining multiple grid computing models. In: Weber, M.H.W. (Ed.) *Distributed & Grid Computing - Science Made Transparent for Everyone. Principles, Applications and Supporting Communities*, pp. 2–13.
- Beakes, G.W., Honda, D. & Thines, M. (2014) Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW (Eds.) *The Mycota VIII Part A*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 39–97. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-93>
- Dick, M.W., Vick, M.C., Gibbings, J.G., Hedderson, T.A. & Lopez-Lastra, C.C. (1999) 18S rDNA for species of *Leptolegnia* and other Peronosporomycetes: justification for the subclass taxa Saprolegniomycetidae and Peronosporomycetidae and division of the Saprolegniaceae sensu lato into the families Leptolegniaceae and Saprolegniaceae. *Mycological Research* 103: 1119–1125. <http://doi.org/10.1017/S0953756299008643>
- Dick, M.W. (2001) *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 670 pp. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9733-3>.
- Diéguez-Urbeondo, J., García, M. A., Cerenius, L., Kozubíková, E., Ballesteros, I., Windels, C., Weiland, J., Kator, H., Söderhäll, K. & Martín, M.P. (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* 46: 365–376. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.004>
- Drechsler, C. (1927) Two water molds causing tomato rootlet injury. *Journal of Agricultural Research* 34: 287–296.
- Drechsler, C. (1929) The beet water mold and several related root parasites. *Journal of Agricultural Research* 38: 309–361.

- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A. & Dumas, A. (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology* 8: 538–548. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x>
- Gomes, A.L., Pires-Zottarelli, C.L.A., Rocha, M., & Milanez, A.I. (2003) Saprolegniaceae de áreas de cerrado do estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea* 30: 95–110.
- 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. <http://doi.org/10.1590/S2236-89062013000100009>
- Johnson, T.W. Jr., Seymour, R.L. & Padgett, D.E. (2002) *Biology and systematics of Saprolegniaceae*. Available from: <http://www.ucnw.edu/people/padgett/book> (accessed 30 May 2016)
- Kazutaka, K. & Daron, M. (2013) MAFFT *Multiple Sequence Alignment Software Version 7*: Improvements in Performance and Usability. Available from: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server> (accessed 27 February 2016) <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Marano, A.V., Jesus, A.L., de Souza, J.I., Leão, E.M., James, T.Y., Jerônimo, G.H., de Cock, A.W.A.W. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2014) A new combination in *Phytophthora*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5: 510–522. <http://dx.doi.org/10.5943/mycosphere/5/4/3>
- Miranda, M.L. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2012) Oomicetos do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea* 39: 95–112. <http://doi.org/10.1590/S2236-89062012000100005>
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2: 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94: 834–849. <http://doi.org/10.2307/3761698>
- Robideau, G.P., de Cock, A.W.A.M., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C.H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B. & Lévesque, A.C. (2011) DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular and Ecological Resources* 11: 1002–1011.
- Rocha, J.R.S. (2006) Filos Chytridiomycota e Oomycota. In: Gusmão, L.F.P & Maia, L.C. (Eds.) *Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido brasileiro*. pp. 75–95.
- Vaidya, G., Lohman, D.J. & Meier, R. (2010) SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171–180.
- Visniac, H.S. (1958) A new marine phycomycete. *Mycologia* 50: 66–79. <http://doi.org/10.2307/3756037>
- Watanabe, T. (1987) *Plectopira myriandra*, a rediscovered water mold in Japanese soil. *Mycologia* 79: 77–81.

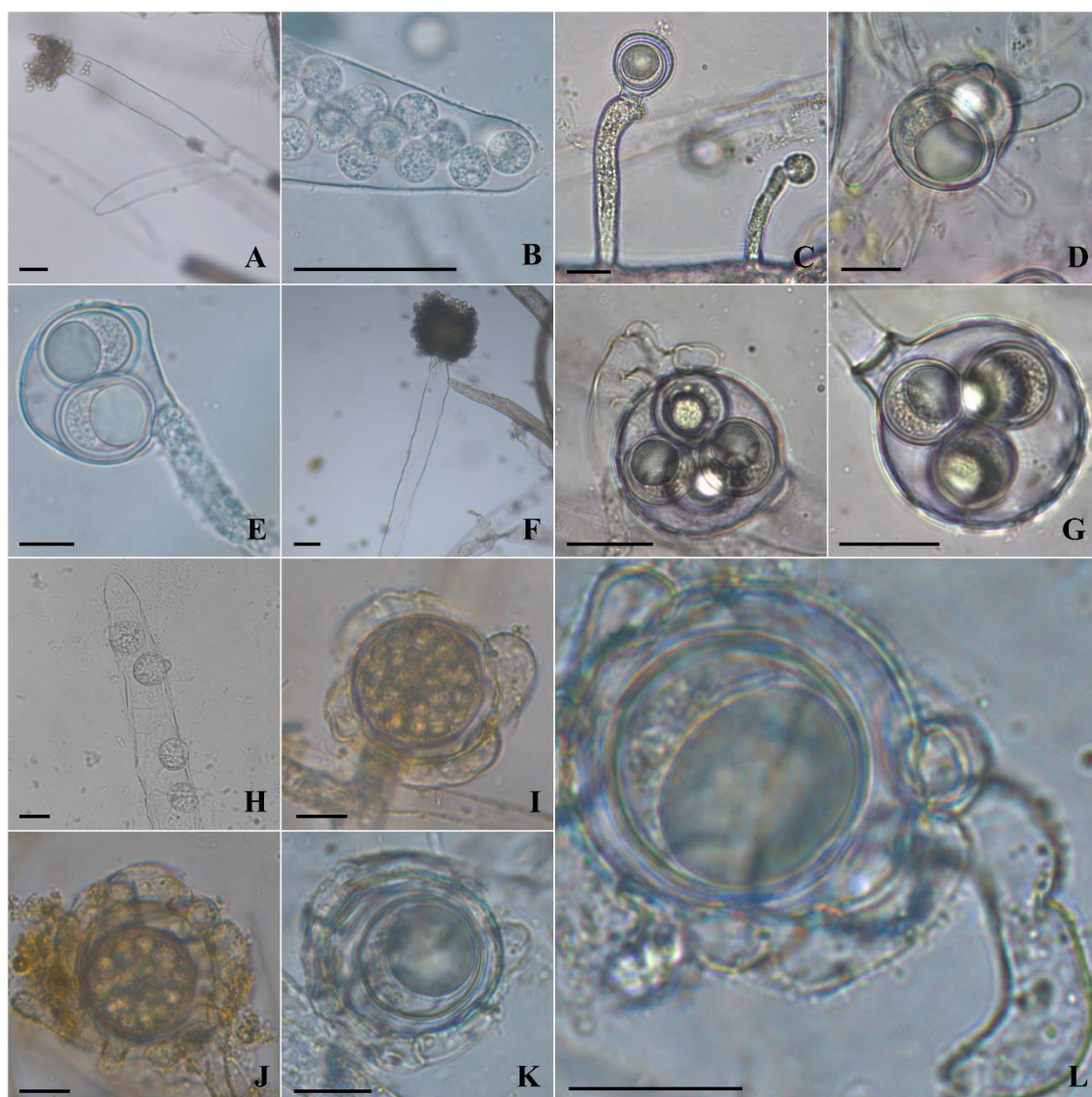
Anexo III



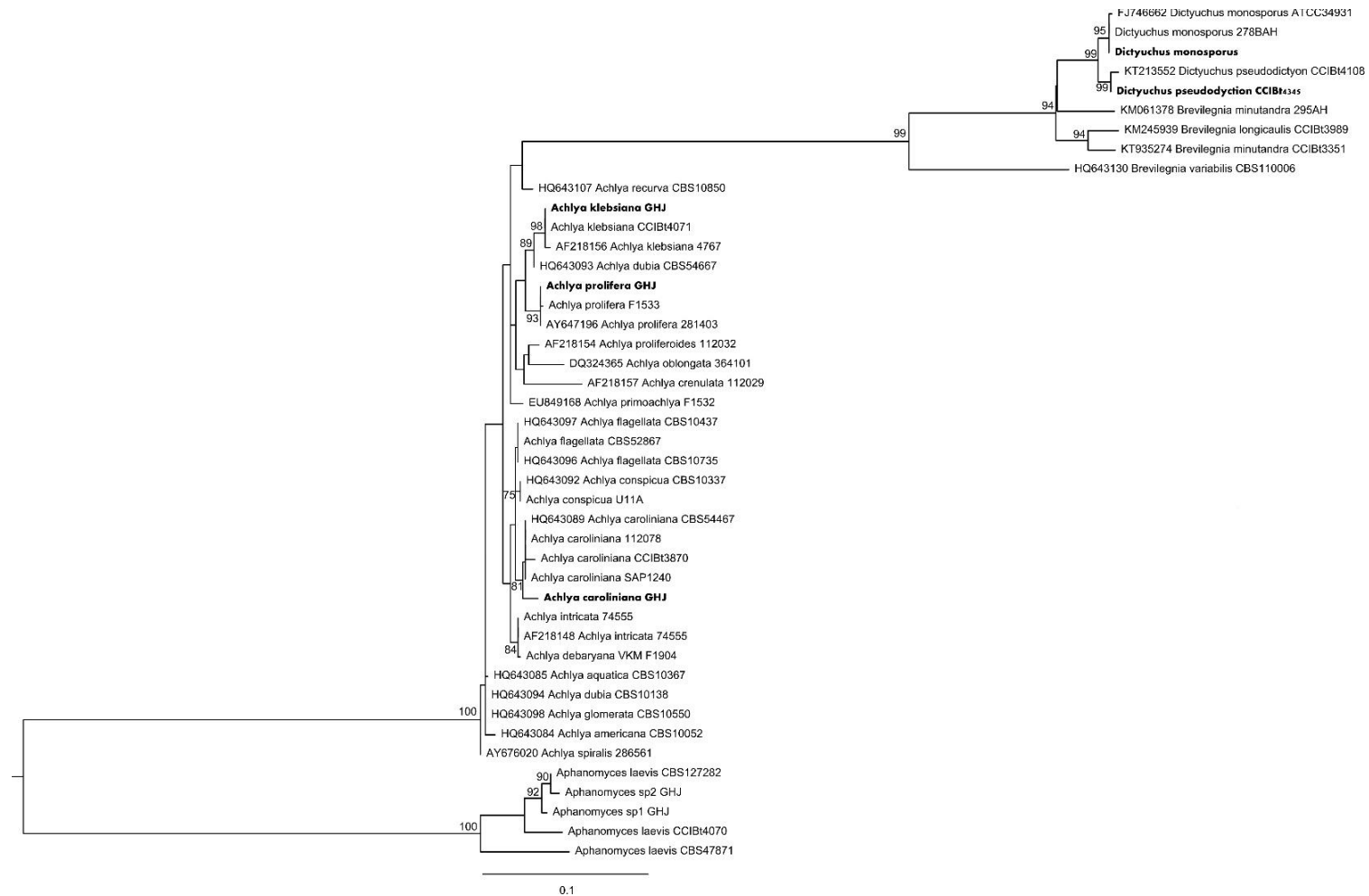
Saprolegnia aenigmatica CCIBt4347 (A) e *Saprolegnia subterranea* CCIBt4346 (B-E). A. Zoosporângio de *Saprolegnia aenigmatica* com proliferação interna. B. Zoosporângio de *Saprolegnia subterranea* com proliferação interna. C-E. Detalhes do anterídio, oogônio, oósporo e tudo germinativo de *Saprolegnia subterranea*. Barras = 10 μ m.



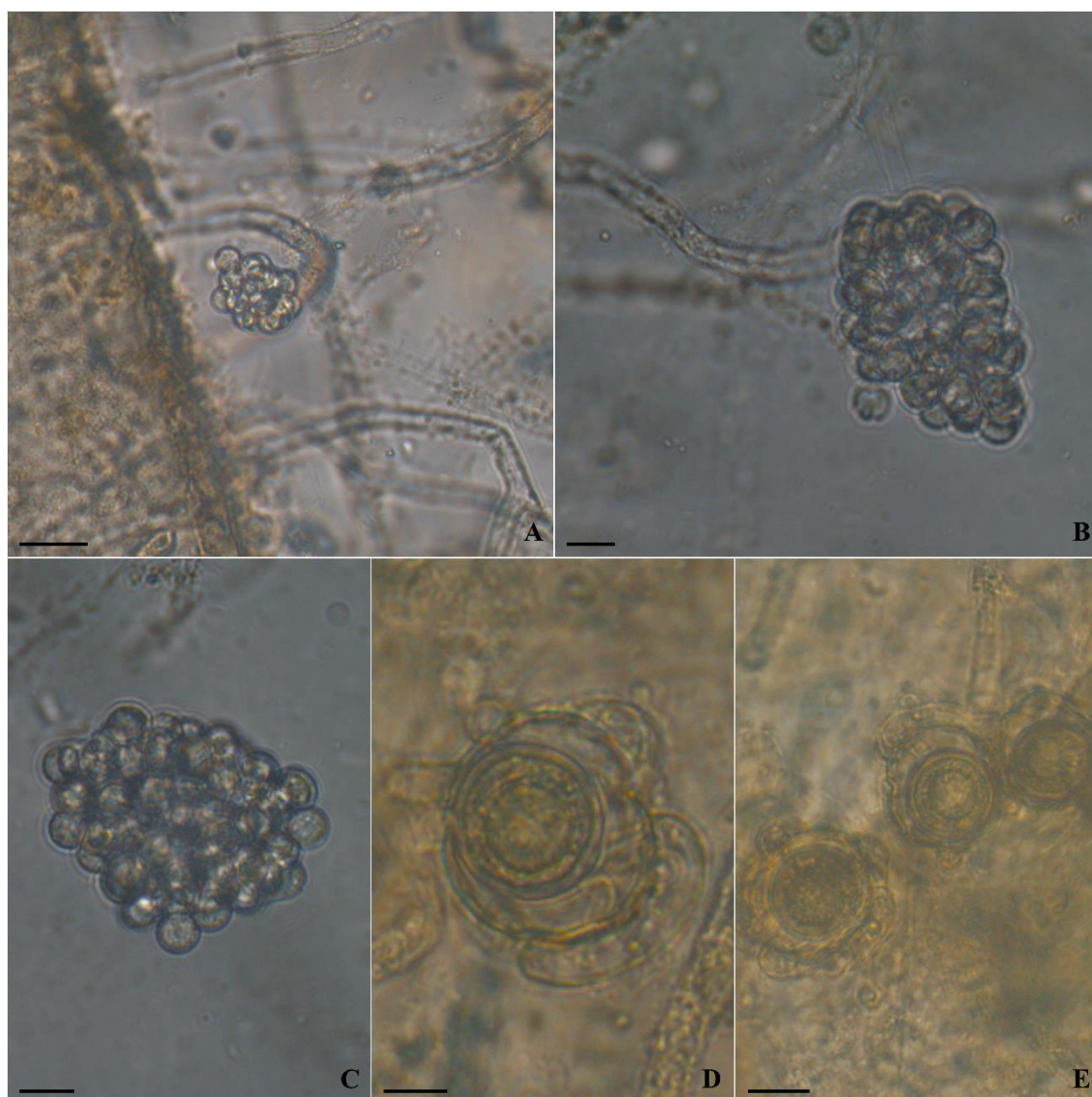
Análise concatenada de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA. Os isolados obtidos durante este estudo estão destacados em negrito. Os números próximos aos ramos representam os valores de “bootstratp”, para os quais foram incluídos na topologia somente os valores acima de 75%.



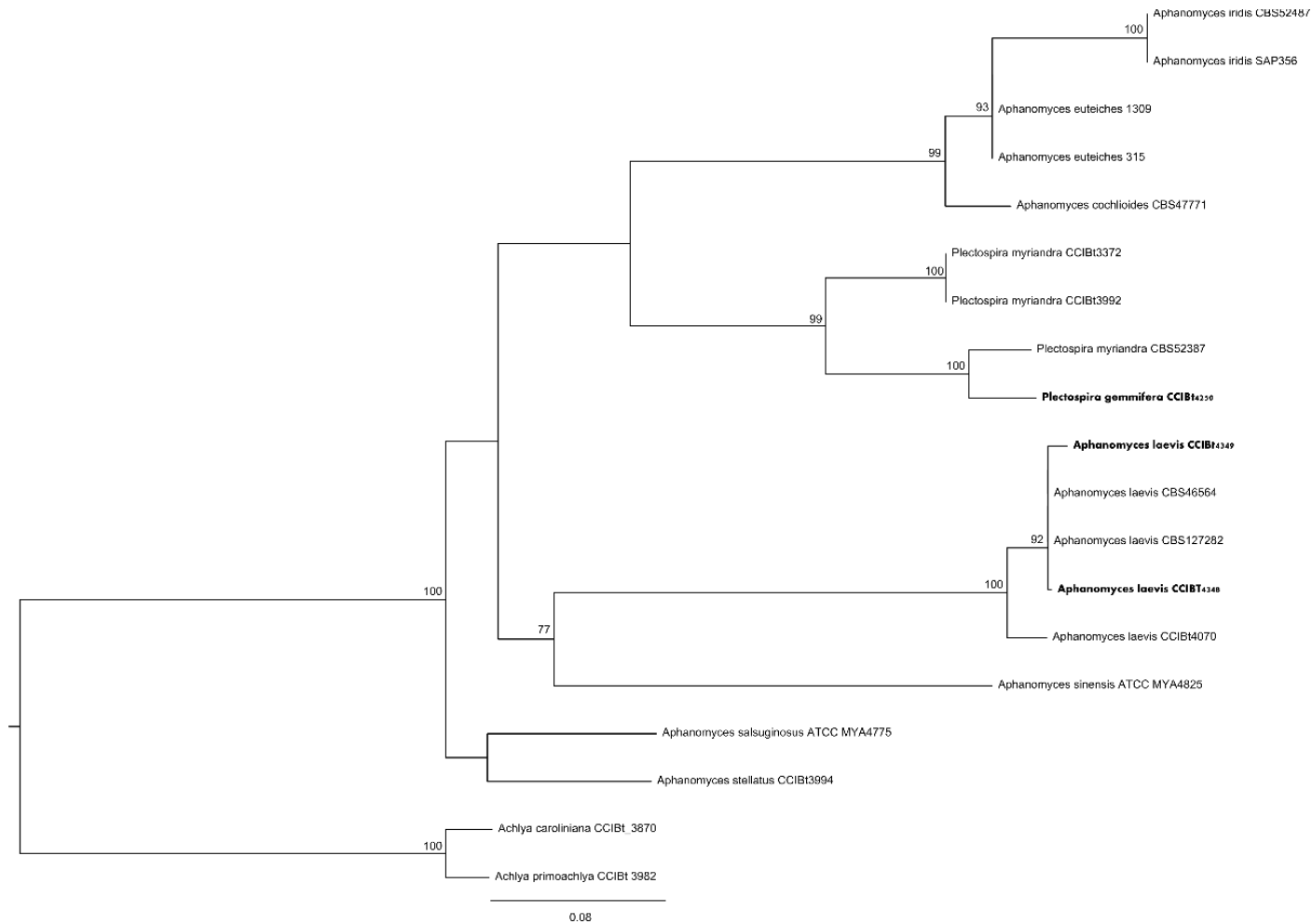
Achlya caroliniana (A-E), *Achlya klebsiana* (F-H), *Dictyuchus pseudodictyon* (H-L). A-B. Zoosporângios de *Achlya caroliniana* mostrando liberação aclióide. C-E. Oogônios com oósporos. F. Zoosporângio de *Achlya klebsiana* mostrando liberação aclióide. G. Oogônio e oósporos de *Achlya klebsiana*. H. Zoosporângio de *Dictyuchus pseudodictyon*. I-L. Oogônio e oósporos de *Dictyuchus pseudodictyon*. Barras = 10 µm.



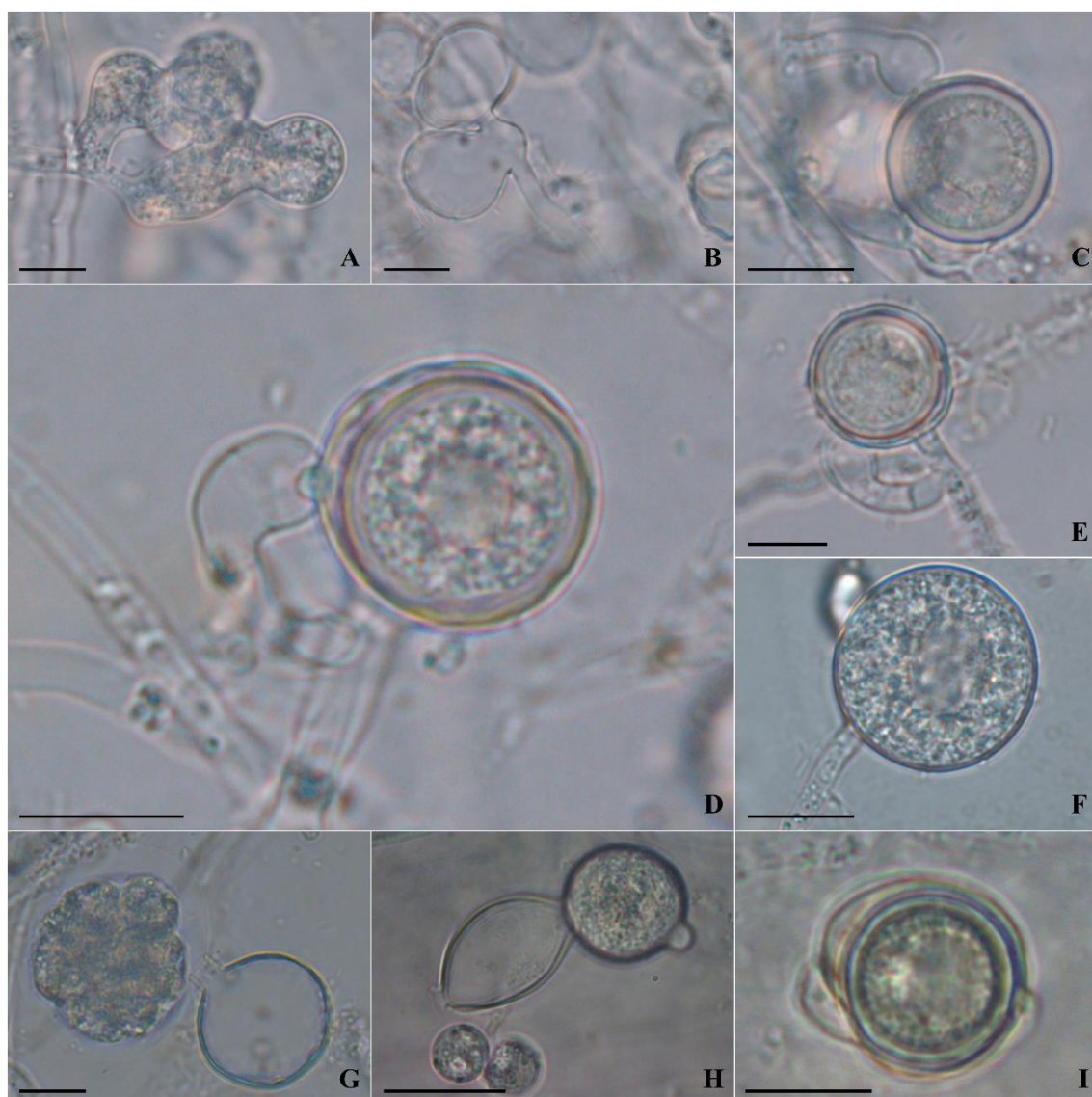
Análise de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA. Os isolados obtidos durante este estudo estão destacados em negrito. Os números próximos aos ramos representam os valores de “bootstratp”, para os quais foram incluídos na topologia somente os valores acima de 75%.



Aphanomyces laevis CCIBt4348 e CCIBt4349. A-C. Zoosporângios com liberação acióide. D-E. Oogônio, oósporos e anterídios. Barras = 10 μm.



Análise de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA. Os isolados obtidos durante este estudo estão destacados em negrito. Os números próximos aos ramos representam os valores de “bootstratp”, para os quais foram incluídos na topologia somente os valores acima de 75%.



Pythium torulosum (A-E) e *Phytopythium vexans* (F-I). A-B. Zoosporângios filamentosos inflados de *Pythium torulosum*. C-E. Oogônio, óosporos e anterídios de *Pythium torulosum*. F-H. Zoosporângio esférico de *Phytopythium vexans*. I. Oogônio e anterídio de *Phytopythium vexans*. Barras = 10 μ m.



Análise concatenada de Máxima Verossimilhança das regiões ITS do rDNA e COX1 do mtDNA. Os isolados obtidos durante este estudo estão destacados em negrito. Os números próximos aos ramos representam os valores de “bootstratp”, para os quais foram incluídos na topologia somente os valores acima de 75%.

Apêndice I

Táxons	Regiões gênicas					
	18S	ITS	28S	RPB1	RPB2	COX1
Chytridiomycota						
<i>Asterophlyctis sarcoptoides</i>	*	*	*			
<i>Avachytrium</i> sp.	*	*	*			
<i>Cladochytrium replicatum</i>	*	*	*	*	*	
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i>	*	*	*			
<i>Nowakowskiella ramosa</i>	*	*	*		*	
<i>Nowakowskiella crenulata</i>	*	*	*			
<i>Nowakowskiella</i> sp.1	*	*	*	*	*	
<i>Rhizophydium angulosum</i>	*	*	*	*	*	
<i>Rhizophydium elyense</i>	*	*	*			
<i>Siphonaria</i> sp.	*	*	*	*		
Oomycota						
<i>Achlya caroliniana</i>		*	*			
<i>Achlya klebsiana</i>		*	*			
<i>Achlya prolifera</i>		*	*			
<i>Aphanomyces laevis</i> CCIBt4348		*	*			
<i>Aphanomyces laevis</i> CCIBt4349		*	*			
<i>Dictyuchus monosporus</i>		*	*			
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>		*	*			
<i>Plectospora gemmifera</i>		*	*			
<i>Pythium inflatum</i>		*	*			*
<i>Pythium midletonii</i>		*	*			*
<i>Pythium torulosum</i>		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.1		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.2		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.3		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.4		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.5		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.6		*	*			*
<i>Pythium</i> sp.7		*	*			*
<i>Phytopythium vexans</i>		*	*			*
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>		*	*			
<i>Saprolegnia subterranea</i>		*	*			
<i>Saprolegnia subterranea</i>		*	*			
<i>Saprolegnia subterranea</i>		*	*			