



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**  
**E BIOTECNOLOGIA BIONORTE**



**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DO MODO DE COLETA**  
**NA DIVERSIDADE DE FUNGOS DECOMPOSITORES DE**  
**MADEIRA SUBMERSA DE AMBIENTES AQUÁTICOS**  
**DA REGIÃO AMAZÔNICA**

**ANA CLÁUDIA ALVES CORTEZ**

**MANAUS - AM**

**JUNHO - 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**  
**E BIOTECNOLOGIA BIONORTE**

**ANA CLÁUDIA ALVES CORTEZ**

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DO MODO DE COLETA**  
**NA DIVERSIDADE DE FUNGOS DECOMPOSITORES DE**  
**MADEIRA SUBMERSA DE AMBIENTES AQUÁTICOS**  
**DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

**Orientador:** Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

**MANAUS**

**JUNHO - 2016**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C828i Cortez, Ana Claudia Alves  
Influência da sazonalidade e do modo de coleta na diversidade de fungos decompositores de madeira submersa de ambientes aquáticos da Região Amazônica / Ana Claudia Alves Cortez. 2016 87 f.: il.; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fungos de água doce. 2. Água preta. 3. Região amazônica. 4. Biodiversidade. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA CLÁUDIA ALVES CORTEZ

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DO MODO DE COLETA  
NA DIVERSIDADE DE FUNGOS DECOMPOSITORES DE  
MADEIRA SUBMERSA DE AMBIENTES AQUÁTICOS  
DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

**Orientador:** Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Banca examinadora

---

Dr. João Vicente Braga de Souza  
Presidente da banca

---

Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

---

Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

---

Dr. José Odair Pereira

---

Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

MANAUS  
JUNHO – 2016

*À minha família, **Micologia-INPA**, especialmente, ao Dr. **João Vicente Braga de Souza**, um professor, orientador, amigo e líder excepcional, pelos ensinamentos e paciência, meu carinho, admiração e respeito;*

*Aos meus familiares, **Maria Helena, Jair, Jair Cláudio, Jordan, Jean, Maria da Conceição, Rosana Meiry, Branca e Sildomar**. In memoriam à **Maria, Lucimar e Adamar Cortez**, pelo carinho e incentivo em toda esta jornada;*

*A todos os **amigos** que sempre incentivaram nesta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

*Á Deus, pela dádiva da vida e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos;*

*Ao Professor Dr. João Vicente Braga de Souza, meu orientador, pelos ensinamentos, conselhos, orientações, confiança, incentivo e principalmente paciência nessa jornada intensa para o desenvolvimento deste trabalho. Minha eterna gratidão.*

*Ao Professor Dr. Steven E. Zelski, pelas orientações, ensinamentos, paciência, incentivo e confiança na realização deste trabalho sobre os fungos de água doce;*

*Á Dra. Carol A. Shearer e Dr. Huzeifa Raja por me apresentar ao fascinante mundo dos fungos de água doce, pelo apoio, ensinamentos e sugestões importantes para a realização deste trabalho;*

*Ao Dr. José Alberto da Costa Machado, quando Coordenador de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde pela oportunidade e incentivo nesta jornada;*

*Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Universidade do Estado do Amazonas (UEA) que ofereceram oportunidade para o aprimoramento profissional;*

*Aos coordenadores do Bionorte, Dr. Spartaco Astolfi Filho, Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza e Dr. Jair Max Furtado Maia, pela orientação e confiança na realização deste trabalho;*

*Á Dra. Maria Gercília Mota Soares pelos ensinamentos e sugestões importantes para o desenvolvimento deste trabalho;*

*Ao MSc. Victor Costa de Souza pelo apoio técnico e orientação na realização deste trabalho;*

*Ao MSc. Josedec Mateus Faria Monteiro, pelo apoio técnico, ensinamentos de coleta e análise das águas para a realização do presente trabalho;*

*Aos amigos, Dra. Aya Sadahiro, Dr. Maurício M. Ogusku, Dra. Luciana Fujimoto; Dr. Jansen Fernandes Medeiros, Dra. Júlia Ignez Salém, MSc. José Augusto Almendros de Oliveira, pelo incentivo, apoio, conselhos e ensinamentos em todos os momentos dessa jornada;*

*A Dra. Aurélia Lopes Castrillon e MSc. Maria do Socorro de Souza Ataíde por apresentar e ensinar os primeiros passos nesta linda área de taxonomia de fungos;*

*Aos professores da Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia BIONORTE, pelos conhecimentos obtidos;*

*Aos senhores, Francisco Bernardo Falcão e Agenor da Glória Corrêa, por permitir o acesso as suas propriedades para a realização dos experimentos desta tese;*

*Aos integrantes da Família Micologia: Alcinira Farias, Alita Moura, Amanda Vasconcelos, Amaury Bentes, Andreza Linhares, Ana Karla, Ana Paula, Beatriz Pereira,*

*Daiana Torres, Deisiane Passos, Diego Fernando, Diego Rayan, Debora Raysa, Eliana Santos, Elusiane Santos, Érica Simplício, Flávia Fernandes, Genciana Contatto, Hellen Sena, Izabelle Noguchi, Jéssica Celestino, João Neto, Joyce Matsuda, Kátia Cruz, Liliane Rocha, Luana Rocha, Luciana Aires, Luciane Fontão, Márcia Regina, Maria do Socorro, Mariane Martins, Michael Ruben, Michele Sanches, Nayara Diniz, Patrícia Mota, Ralyvan Araújo, Rildo Lima, Roberto Moreira, Rodrigo Ribeiro, Sara Jessica, Silviane Pinheiro, Socorro Borges, Tatiana Freitas, Thaís Karoline, Walter Segundo e Rosalvo Balbino, pelo apoio, incentivo, companheirismo e ajuda nesta jornada, sem os quais não teria conseguido realizar o presente trabalho;*

*A todos os alunos da turma de doutorado, em especial a **Andreia Ferreira, Andreia Lanza, Arlene, Dolores, Elissandro, Fátima, Hilton Marcelo, João Marcelo, Jucileuza e Neuler** pelo incentivo, apoio, carinho e companheirismo nesta intensa jornada;*

*A todos os companheiros do laboratório de micobacteriologia, **Raimundo, Francisco, Maísa e João** pelo companheirismo de todos os dias;*

*A minha mãe **Maria Helena** a quem devo tudo o que estou conquistando, sem a qual não teria conseguido chegar até o final desta jornada;*

*Ao meu esposo **Jair Abreu** pela compreensão, paciência, carinho, incentivo e estar sempre ao meu lado em todos os momentos desta jornada;*

*Aos meus filhos **Jair Cláudio, Jordan e Jean** pela compreensão das constantes ausências para conseguir finalizar esta jornada;*

*Aos irmãos **Maria da Conceição, Rosana Meiry, Branca e Sildomar** por todo apoio, carinho e incentivo nesta jornada;*

*Aos meus pais de direito (in memoriam) **Maria Cortez**, professora de visão futurista e **Lucimar Cortez**, leigo para a escrita, porém, um doutor em conhecimentos da biodiversidade no Amazonas. Exemplos a serem seguidos de honestidade, humildade, integridade e religiosidade para com todos os familiares. Minhas eternas saudades.*

*Á todos os integrantes da **Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde**, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho;*

*Á todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

*“A virtude da vida não está em fazer aquilo que se gosta, e sim gostar daquilo que se faz. Por isso seja forte, não como as ondas que tudo destrói, mas como as pedras que tudo suporta!”*

*Clarice Lispector*



## RESUMO

Apesar da grande importância ecológica, pouco se conhece sobre os fungos de água doce da Região Amazônica. O objetivo geral da presente tese foi investigar a influência da sazonalidade e do modo de coleta na diversidade de fungos decompositores de madeira submersa em ambientes aquáticos da Região Amazônica. A presente tese possui 3 capítulos: a) O primeiro capítulo visou comparar a biodiversidade da comunidade fúngica durante a estação não chuvosa e chuvosa em um pequeno lago de águas pretas no Amazonas, Brasil; b) O segundo capítulo teve como objetivo estabelecer o posicionamento filogenético de *Longicollum biappendiculatum* e realizar uma análise micromorfológica de novos indivíduos isolados na Amazônia Brasileira e c) O terceiro capítulo teve como objetivo descrever a diversidade de fungos presentes em amostras de madeira de um ambiente lótico na Amazônia e avaliar se a metodologia “iscas de madeira” era adequada como metodologia utilizada para amostragem. Para comparação da biodiversidade do ambiente lêntico na estação não chuvosa e chuvosa da Amazônia (Capítulo I) foi realizado o estudo da diversidade de fungos de um total de quatro coletas de madeira submersa em um período de um ano (Maio, Agosto e Novembro de 2013 e Fevereiro de 2014). Para o posicionamento filogenético de *L. biappendiculatum* (Capítulo II) foram feitas análises taxonômicas morfológicas e filogenéticas. Por fim, para avaliação da metodologia “iscas de madeira” (Capítulo III), foi investigada a diversidade fúngica de 30 fragmentos de madeira naturalmente em decomposição e comparada a de 30 iscas de madeira (fragmentos de madeira propositalmente colocados em decomposição por 6 meses). Quanto aos resultados da comparação da biodiversidade do ambiente lêntico nas duas estações da Amazônia (Capítulo I), observou-se que nas madeiras coletadas do ambiente lêntico investigado existia uma riqueza de biodiversidade fúngica equilibrada no ecossistema de água preta, e que o período chuvoso apresenta um número superior de táxons (aumento causado por elevado número de fungos mitospóricos). Quanto ao posicionamento filogenético de *L. biappendiculatum* (Capítulo II), as análises filogenéticas aplicadas demonstraram que essa espécie faz parte da família Annulatascaceae *stricto sensu*. Quanto a aplicação da metodologia “iscas de madeira” para investigar a diversidade de um ambiente lótico de nossa região (Capítulo III), concluiu-se que, no ambiente lótico investigado foi observada alta diversidade fúngica nas madeiras coletadas e que o método de “iscas de madeira”, nas condições experimentais, não foi adequado para descrever essa diversidade.

**Palavras-chave:** Biodiversidade, Fungos de água doce, Região Amazônica, Água preta.

## ABSTRACT

Despite the great ecological importance, little is known about freshwater fungi in the Amazon region. The overall objective of this thesis was to investigate the influence of seasonality and collection mode in the diversity of fungal decomposers of submerged wood in aquatic environments in the Amazon region. This thesis has three chapters: a) The first chapter was to compare the biodiversity of the fungal community during non-rainy and rainy season in a small lake of black water in the Amazon, Brazil; b) The second chapter proposed to establish the phylogenetic position of *Longicollum biappendiculatum* and perform a micromorphological analysis of new single individuals in the Brazilian Amazon and c) The third chapter aimed to describe the diversity of fungi present in wood samples of a lotic environment in the Amazon and evaluate the methodology "bait timber" was suitable as a methodology for sampling. To compare the biodiversity of the lentic environment in rainy and not rainy season the Amazon (Chapter I) was conducted to study the diversity of fungal a total of four wooden collections submerged in a period of one year (May, August and November 2013 and February 2014). For the phylogenetic position of *L. biappendiculatum* (Chapter II) analyzes were performed morphological and phylogenetic taxonomy. Finally, to review the methodology "bait timber" (Chapter III) was investigated fungal range of 30 wood fragments naturally decomposition and compared to 30 Wood baits (wood fragments purposely placed decaying over 6 months). As for the results of the comparison of biodiversity to the still water environment in the two seasons of the Amazon (Chapter I), it was observed that in the woods collected from the investigated lentic environment existed a wealth of balanced fungal biodiversity in the ecosystem of black water, and the rainy season has a higher number of taxa (increase caused by large number of mitosporic fungi). As for the phylogenetic positionamento of *L. biappendiculatum* (Chapter II), phylogenetic analysis applied showed that this taxon is part of the *strict sense* Annulatascaceae family. The application of the methodology "bait timber" to investigate the diversity of a lotic environment of our region (Chapter III), it was concluded that in lotic investigated showed high diversity fungal the collected woods and the method of "bait timber", the experimental conditions, it was not appropriate to describe this diversity.

**Keywords:** Biodiversity, Fungi freshwater, Amazon region, Black water.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1.

**Figura 1.** Curva de acumulação do número de táxons de fungos em relação ao esforço amostral de coleta de fragmentos de madeira, em decomposição e submersas, no Lago "Parque das Águas San Raphael", em Iranduba-Amazonas-Brasil. Amostras de madeiras coletadas períodos de maio, agosto e novembro de 2013 e fevereiro 2014. **39**

### Capítulo 2.

**Figura 1.** Filograma da árvore mais provável a partir da análise do gene 28S rRNA obtida com RAxML (-lnL = 6581,2407). Números atribuídos a filiais indicam valores de suporte de inicialização  $ML \geq 70\%$ , valores de suporte de probabilidade posterior  $\geq 95\%$  são indicados por ramos engrossados. Táxons em negrito representam aqueles com genes recém-sequenciados. **57**

**Figura 2.** Filograma da árvore mais provável da sua análise gene nrRNA obtida com RAxML (-lnL = 9475,0608). Números atribuídos a filiais indicam valores de suporte de inicialização  $ML \geq 70\%$ , valores de suporte de probabilidade posterior  $\geq 95\%$  são indicados por ramos engrossados. Táxons em negrito representam os isolados com genes Its recém-sequenciados e com as identidades das sequências de táxons corrigidos e depositadas no GenBank. **58**

**Figura 3.** A. Pescoço saliente a partir da superfície. B. Pescoço montado em água. C. Pescoço ilustrando ponta hialina. D. Pescoço ilustrando superfície e paráfises. E. Ascus. F. Paráfises. G, H. Ápice dos ascus. I-K. Ascósporos. Escala de Bars: A, B = 100  $\mu\text{m}$ ; C = 200  $\mu\text{m}$ ; D-G, I-K = 20  $\mu\text{m}$ ; H = 10  $\mu\text{m}$ . **59**

### Capítulo 3.

**Figura 1.** Curva de acumulação do número de táxons de fungos em relação ao esforço amostral de madeira naturalmente em decomposição e de iscas de madeira (decompondo submersas por 6 meses), no igarapé do Tarumã Açu, Manaus, AM. **72**

## LISTA DE QUADROS

Novos táxons de fungos presentes em ambientes aquáticos  
**Quadro 1:** descritos a partir de 2010 pertencentes as classes dos **24**  
Sordariomycetes e Dothideomycetes.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1.

**Tabela 1.** Características físico-químicas da água do "Parque das Águas San Raphael" em Iranduba-Amazonas-Brasil durante a estação chuvosa e não-chuvosa. **38**

**Tabela 2.** Número e abundância relativa (%) dos táxons de fungos, presentes nas amostras de madeira em decomposição, coletadas no Lago "Parque das Águas San Raphael" (Iranduba-Amazonas-Brasil), nas estações chuvosa e não chuvosa. **41**

**Tabela 3.** Comparação da diversidade de fungos presentes em amostras de madeira submersas coletadas, nas estações chuvosa e não chuvosa, no Lago "Parque das Águas San Raphael" (Iranduba-Amazonas-Brasil). **42**

### Capítulo 2.

**Tabela 1.** Números de acesso GenBank das sequências 28s e ITS das sequências analisadas neste estudo. Os números em negrito representam sequências recém-geradas. **51**

**Tabela 2.** Números de depósito das sequências no GenBank, código do isolados e origem dos isolados de *Longicollum biappendiculatum* avaliados no presente estudo. **55**

### Capítulo 3.

**Tabela 1.** Número e abundância relativa (%) dos táxons de fungos, presentes em amostras de madeira do tipo isca submersas por 6 meses no Igarapé "Tarumã-Açu" (Manaus-Amazonas-Brasil). **73**

**Tabela 2.** Número e abundância relativa (%) dos táxons de fungos, presentes em amostras de madeira naturalmente em decomposição no Igarapé "Tarumã-Açu" (Manaus-Amazonas-Brasil). **74**

**Tabela 3.** Comparação da diversidade de fungos presentes em amostras de madeira naturalmente em decomposição e de madeira do tipo isca submersas no igarapé "Tarumã-Açu" (Manaus-Amazonas-Brasil). **76**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Biodiversidades dos fungos de água doce.....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Ecossistemas aquáticos.....	16
2.1.2 Biologia e Classificação dos fungos presentes em ambientes aquáticos.....	19
2.1.3 Distribuição geográfica dos táxons de água doce.....	22
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CAPÍTULO 1.</b> Comparação da comunidade de fungos de água doce durante a estação não chuvosa e chuvosa em um pequeno lago de água preta no Amazonas, Brasil.....	<b>31</b>
<b>7. CAPÍTULO 2.</b> Posição filogenética de <i>Longicollum biappendiculatum</i> com base no DNAr das regiões ITS e 28S de indivíduos isolados a partir de madeira submersa do Peru e Brasil.....	<b>48</b>
<b>8. CAPÍTULO 3.</b> Avaliação do método de iscas de madeira para investigação da diversidade de fungos presentes em madeira submersa e em decomposição no igarapé Tarumã Açu, Manaus, Amazonas, Brasil.....	<b>65</b>
<b>9. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>10. APÊNDICE.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos presentes nos ambientes aquáticos apresentam importância ambiental pois participam da decomposição do material vegetal submerso e servem de alimento para vertebrados, invertebrados e outros microrganismos (SRI-INDRASUTDHI et al., 2010; KRAUSS et al., 2011; JONES; PANG, 2012). Apesar da grande importância ecológica desses organismos, a sua diversidade é desconhecida em várias regiões do planeta, incluindo a Amazônia.

Na Amazônia, os primeiros estudos publicados sobre a diversidade desse grupo de microrganismos surgem apenas nos últimos cinco anos. Zelski et al. (2011a, b, 2015) realizaram estudos descrevendo os táxons (inclusive novos táxons) da Amazônia peruana envolvidos na decomposição de madeira submersa, e os trabalhos de Monteiro et al. (2014), Monteiro e Gusmão (2014) descreveram algumas espécies associadas a decomposição de folhas.

Frente ao tamanho e a complexidade da bacia Amazônica, esse número de estudos existentes é pequeno (AVILA-CABADILLA et al., 2009; PINTO et al., 2009; QUEIROZ et al., 2009; APRILE et al., 2013). São necessários mais trabalhos descrevendo a diversidade de fungos nas diferentes águas da Amazônia (águas pretas, águas brancas e águas claras), nos diferentes sistemas (lênticos e lóticos) e nas associações desses organismos com os diferentes substratos aquáticos. Além dessas abordagens, ainda são necessários estudos que avaliem o efeito da sazonalidade regional e da forma de coleta de amostras na diversidade fúngica.

Recentemente, um estudo ecológico demonstrou que os fungos aquáticos da Amazônia participam significativamente como base da cadeia alimentar dos organismos existentes nos rios de águas pretas (WALKER, 2009). Além da sistematização e do entendimento da função ecológica, esses fungos necessitam ser conhecidos devido ao seu potencial biotecnológico na

produção de antimicrobianos, enzimas e outras substâncias de interesse. Além disso, deve ser dito que esses estudos devem ser realizados o quanto antes, uma vez que, devido ao avanço da influência antropogênica, muitos habitats vem sendo destruídos e dessa forma, a sociedade vem perdendo um potencial conhecimento desta biodiversidade que pode ser relevante para as próximas gerações.

Frente ao exposto, justifica-se a necessidade da realização de trabalhos estudando a diversidade de fungos em diferentes ambientes aquáticos da Amazônia, bem como, a necessidade de trabalhos que avaliem o efeito da sazonalidade regional e da forma de amostragem na diversidade.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Diversidade dos fungos de água doce**

#### **2.1.1 Ecossistemas aquáticos**

De modo geral, os ecossistemas aquáticos podem ser classificados em continentais e marinhos. Nos ecossistemas marinhos temos os oceanos, os estuários, os recifes de corais e os manguezais. Os ecossistemas continentais são divididos em três classes: a) lóticos: constituído pelos rios, riachos, córregos e aquíferos subterrâneos; b) lênticos: constituído pelos lagos e as lagoas, e c) híbridos ou artificiais: constituídos pelas represas ou reservatórios (HU et al., 2010; JONES; PANG, 2012; NUNES; FERREIRA; REGINATO, 2013).

Os ecossistemas lóticos são considerados sistemas abertos com estrutura tridimensional (longitudinal, lateral e vertical), caracterizados por processos altamente dinâmicos frente às mudanças climáticas e temporais. Os ecossistemas lênticos são



considerados sistemas semiabertos, caracterizados por processos menos dinâmicos. Os reservatórios ou represas podem ser considerados ecossistemas híbridos de rios e lagos, os quais geralmente são divididos em zonas conforme a influência dos ecossistemas lóticos e lênticos (NUNES; FERREIRA; REGINATO, 2013).

Quanto aos ecossistemas continentais, a Amazônia é uma das mais importantes coleções de ambientes aquáticos. Localiza-se no Norte do Brasil, América do Sul, na qual encontram-se a maior floresta tropical e bacia de água doce do mundo que é composta de grandes rios, muitos lagos e áreas de várzea (zonas úmidas inundadas pelos rios periodicamente todos os anos (APRILE et al., 2013).

Sua vegetação é classificada em Floresta Densa Tropical ou popularmente chamada de Floresta de Terra Firme e Floresta Aberta Tropical. A maioria da área é recoberta por floresta de terra firme, onde as espécies dominantes entre as árvores altas pertencem as famílias: Leguminosae, Lecythidae e Sapotaceae. O clima tropical, quente e úmido, com temperatura média no verão de 28 °C e no inverno de 23 °C. A maior parte do solo é considerada quimicamente pobre, mas, é coberto por uma camada de material orgânico, que serve de alimento para insetos e o desenvolvimento de fungos (AVILA-CABADILLA et al., 2009).

Neste ecossistema, suas águas são classificadas em claras, pretas e brancas, sendo formada por uma diversidade de corpos d'água, como rios, lagos e pequenos riachos (igarapés). Nela existem os mais diversos ecossistemas aquáticos, e essa diversidade, ocorre devido o ciclo hidrológico que é subdividido em quatro períodos: seca, enchente, cheia e vazante (PINTO et al., 2009; QUEIROZ et al., 2009).

A maioria dos igarapés de terra firme apresentam águas ácidas devido à presença de ácidos húmicos e fúlvicos. Quanto aos nutrientes, suas águas são pobres, pois, as árvores se fecham sobre os mesmos, impedindo a luz de atingir a superfície da água, o que faz com que

as plantas aquáticas sejam limitadas, assim como a biota em geral (MENDONÇA; MAGNUSSON; ZUANON, 2005; HORBE; OLIVEIRA, 2008; QUEIROZ et al., 2009).

Os lagos possuem tamanhos e formas variadas, submetidos ao pulso de inundação anual e a flutuação temporal do nível hidrométrico dos rios, podem ser delimitados períodos durante o ciclo sazonal. Existem dois períodos extremos, a não chuvoso (águas baixas), onde o lago apresenta menor volume de água e pode ou não ter comunicação com o rio e o chuvoso (águas altas), com grande aporte de água dos rios para os ambientes lacustres (THOMAZ; BINI; BOZELLI, 2006). Todavia, para os locais de terra-firme, a inundação não se aplica, pois os mesmos, não possuem padrão regular de inundação sazonal (MENDONÇA; MAGNUSSON; ZUANON, 2005).

As águas pretas que compõem a bacia Amazônica são consideradas pobres, nessas, as cadeias alimentares dependem do material alóctone proveniente da floresta (pólen, flores, frutos, folhas, material lenhoso, insetos e aranhas) (MENDONÇA; MAGNUSSON; ZUANON, 2005; QUEIROZ et al., 2009). Sendo que, os fungos presentes em ambientes aquáticos realizam importante papel como decompositores, como fonte de energia na cadeia alimentar e no ciclo de nutrientes (WALKER, 2009; SRIDHAR; KARAMCHAND; HYDE, 2010; KRAUSS et al., 2011).

De forma geral, a biodiversidade vem sofrendo enormes perdas devido as intervenções antropogênicas. A perda da biodiversidade é um dos temas ambientais fundamentais para o Brasil ao longo de século XXI, mas não existem cálculos confiáveis para avaliar a magnitude dessa extinção. Mesmo sendo a Amazônia um dos biomas brasileiros mais intensamente estudados nessas últimas décadas, em termos de seu funcionamento ecológico, os diferentes níveis da biodiversidade são pouco conhecidos, inclusive sua taxa de extinção (SALATI; SANTOS; KLABIN, 2006).

### **2.1.2 Biologia e Classificação dos fungos presentes em ambientes aquáticos**

Os fungos presentes nos ambientes aquáticos podem ser classificados como residentes ou transeuntes. Os residentes reproduzem-se e são apenas encontrados nos ambientes aquáticos, enquanto que, os transeuntes são aqueles que são carreados para esse ambiente (SHEARER et al., 2007; PEARMAN; TAYLOR; KINGHORN, 2010).

Esses fungos possuem ampla distribuição geográfica e são capazes de colonizar os mais diversos substratos como caules, folhas mortas de plantas herbáceas e lenhosas, de ambientes preservados e ou impactados, devido a sua capacidade de adaptação ao meio ambiente (SCHOENLEIN-CRUSIUS, 2007; SHEARER et al., 2007; JONES; PANG, 2012).

Atualmente, dos sete filos propostos para o reino Fungi (Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota) os organismos mais frequentemente isolados de ambientes aquáticos são os pertencentes aos filos Chytridiomycota, Ascomycota e Basidiomycota (HIBBETT et al., 2007; SHEARER et al., 2007).

O filo Chytridiomycota compreende duas classes: Chytridiomycetes e Monoblepharidomycetes. Esse filo é considerado o mais primitivo dentre os fungos. Existe cerca de 1000 espécies, a maioria aquáticas e presente em águas doces. Caracteriza-se por produzir células móveis (zoósporos e gametas), que podem ser uni ou poliflagelados, do tipo chicote, posteriormente inserido. Vivem como saprófitos ou parasitas de: algas, anfíbios, outros fungos, animais microscópicos e plantas superiores. Possuem talo cenocítico e reprodução assexuada e sexuada (HIBBETT et al., 2007; SHEARER et al., 2007; KIRK et al., 2008).

Os representantes do filo Basidiomycota estão divididos em três classes/sub-filos: Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina. Esses organismos são

considerados cosmopolitas que vivem predominantemente em ambiente terrestre, mas, podem ocorrer em ambiente aquático. Conhecidos como cogumelos, tem como característica principal a presença de basídio contendo basidiósporos. São predominantemente miceliais, podendo também, ser unicelulares ou pseudomiceliais. A reprodução é sexuada e ou assexuada. São sapróbios, porém, alguns são parasitas de animais, algas, vegetais e de outros fungos (HIBBETT et al., 2007; KIRK et al., 2008).

O filo Ascomycota possui três subfilos, o Saccharomycotina, onde se encontra a maioria dos fungos leveduriformes com apenas uma ordem Saccharomycetales, o Taphrinomycotina com 4 classes (Neoelectromycetes, Pneumocystidiomycetes, Schizosaccharomycetes, Taphrinomycetes) com fungos filamentosos e leveduriformes e Pezizomycotina com 10 classes (Sordariomycetes, Leotiomyces, Lecanoromycetes, Lichinomycetes, Laboulbeniomycetes, Eurotiomycetes, Arthoniomycetes, Dothideomycetes, Pezizomycetes e Orbiliomycetes) com espécies filamentosas. A reprodução é sexuada e/ou assexuada, e a sexuada é caracterizada pela formação de ascomas, conhecidos como corpos de frutificação, onde são produzidos os ascos e dentro desses os ascósporos, responsáveis pela dispersão. Os ascomas podem ser macroscópicos ou microscópicos, em formato de taça (apotécio), garrafa (peritécio) e de esfera fechada (cleistotécio), de acordo com o grupo. Esses fungos são cosmopolitas, vivendo em ambiente terrestre e aquático, continental ou marinho (HIBBETT et al., 2007; KIRK et al., 2008). Esse filo é o mais prevalente nos ambientes de água doce (SHEARER et al., 2007; JONES; PANG, 2012) e, devido a temática do presente projeto, os parágrafos a seguir trazem mais informações sobre eles.

Os Ascomycetes presentes nos ambientes aquáticos são sapróbios, colonizam e decompõem os substratos submersos, sendo importantes na cadeia alimentar como fonte de alimento para os invertebrados (SIMONIS; RAJA; SHEARER, 2008). Esses táxons compartilham várias características morfológicas, incluindo a presença de ascósporos

apresentando bainhas gelatinosas e apêndices que presumivelmente tem a função na fixação dos esporos em substratos presentes na água. Atualmente, sabe-se que 577 espécies são encontradas nos ambientes de água doce e a maioria pertencem as classes dos Orbiliomycetes, Dothideomycetes e Sordariomycetes (SHEARER et al., 2009; JONES; PANG, 2012; SHEARER et al., 2015).

Os Orbiliomycetes são representados por uma única ordem e família, Orbiliales e Orbiliaceae respectivamente. São aceitos três gêneros teleomorfos (*Hyalorbilia*, *Orbilia* e *Pseudorbilia*) e aproximadamente 10 anamorfos (Hyfomycetes). Os teleomorfos são apotécios pequenos em forma de disco, translúcido formados no solo e madeira. Os ascos unitunicados pequenos e normalmente os ascósporos sem septos pequenos hialinos. São saprófitos e alguns anamórfos são predadores de nematoides (ZHANG et al., 2007; KUMAR et al., 2012; PFISTER, 2015).

Nos organismos Dothideomycetes, o ascomata tem forma de cleistotécio ou peritécio com ascos bitunicados ou fissitunicados. Ecologicamente, podem ser patógenos de vegetais, endófitos ou sapróbios. Crescem em restos de madeira e folhas em decomposição (SPATAFORA et al., 2006). As espécies de água doce corresponde a aproximadamente 30% dos Ascomycetes aquáticos e pertencem ao táxon Pleosporomycetidae, principalmente nas ordens Pleosporales e Jahnulales (SHEARER et al., 2009).

A classe Sordariomycetes, que é uma das maiores do filo Ascomycota, possui mais de 600 gêneros e 3.000 espécies conhecidas. Essa classe é a mais importante entre os fungos de água doce com 266 espécies descritas nesse habitat. Ela inclui a maioria dos ascomycetes com ascoma em forma de peritécio ou com menos frequência cleistotécio, os ascos são inoperculados e unitunicados ou prototunicados. A presença ou ausência de um anel apical (amilóide ou não amilóide) é uma característica importante na classificação. Na atual classificação, encontram-se três subclasses a Hypocreomycetidae, Sordariomycetidae e

Xylariomycetidae. Esses são organismos cosmopolitas e atuam em quase todos os ecossistemas como sapróbios, agentes patogênicos, endofíticos e parasitas, de artrópodes, mamíferos e fungos (ZHANG et al., 2006; KIRK et al., 2008; DONG et al., 2009).

Os gêneros, pertencentes aos Sordariomycetes, exclusivos de água doce são *Aquaticola*, *Cataractispora*, *Pseudoproboscispora*, *Rivulicola* e *Torrentispora* e os Dothideomycetes mais descritos são *Jahnula* e *Mamillisphaeria* (VIJAYKRISHNA; JEEWON; HYDE, 2006; ZHANG et al., 2006).

Fungos Anamorfos ou Conidiais, também denominados de Fungos Imperfeitos ou Fungos Mitospóricos, tem como característica principal a reprodução assexuada, onde ocorre a produção de conídios. Podem ter a forma filamentosa ou leveduriforme, onde a reprodução é por brotamento e formação de pseudomicélio. Nos ecossistemas são sapróbios, parasitas e mutualistas. Neste grupo encontram-se os Hyfomycetes aquáticos, os quais apresentam os conídios hidrodinâmicos ou tetra radiados, classificados como fungos ingoldianos e aeroquáticos, são cosmopolitas, mas predominando em ambientes lóticos (SHEARER et al., 2007; BARLOCHER, 2009; KRAUSS et al., 2011; JONES; PANG, 2012).

### **2.1.3 Distribuições geográfica dos táxons de água doce**

Os ecossistemas aquáticos proporcionam um habitat para muitos grupos, incluindo: fitoplâncton, zooplâncton, plantas aquáticas, insetos, peixes, répteis, aves, mamíferos e microrganismos. A diversidade de microrganismos nestes ecossistemas varia conforme as condições ambientais de tal ecossistema, principalmente em relação à concentração de nutrientes, de acordo com a latitude, longitude e altitude e profundidade (BARLOCHER, 2009; KRAUSS et al., 2011).

Os grupos de fungos presentes em ambientes aquáticos são universalmente distribuídos, possuem elevado potencial adaptativo e são encontrados em ambientes preservados e ou impactados. Atuam em diversos substratos, entre os quais, estão as plantas herbáceas e lenhosas, com seus caules e folhas mortas. Existe a tendência de uma maior diversidade de espécies nos trópicos, pois, as condições ambientais, como alta temperatura e umidade, favorecem o seu crescimento (KRAUSS et al., 2011; JONES; PANG, 2012).

Até o presente momento, os países temperados, devido ao seu esforço amostral, descreveram a maior parte do conhecimento que se possui sobre os fungos presentes em ambientes aquáticos. No entanto, estudos contemporâneos vem sendo cada vez mais conduzidos na América do Sul, China e Austrália (SHEARER et al., 2015). De uma forma geral, pode-se afirmar que, pouco se conhece sobre a diversidade dos fungos presentes em águas (RAJA; SCHMIT; SHEARER, 2009).

Grande parte das publicações sobre os táxons presentes em ambientes aquáticos tem como foco a descrição de novas espécies. O Quadro 1 apresenta os novos táxons de fungos aquáticos, descritos a partir de 2010 e pertencentes as classes dos Sordariomycetes e Dothideomycetes. Na classe dos Hyfomycetes, foi descrita a espécie *Canalisporium grenadoidia* na Tailândia (SRI-INDRASUTDHI et al., 2010); *Aquapeziza globispora* na China (HU et al., 2010b); no Brasil, *Ceratosporella amazônica*, *C. hernandezii*, *Atrogeniculata submersa* e *Nigrolentilocus amazonicus* ((MONTEIRO; GUSMAO, 2014; MONTEIRO; GUSMÃO; CASTAÑEDA-RUIZ, 2014).

No Quadro 1, pode-se observar que a maioria das novas espécies foram descritas em países tropicais.

**Quadro 1** - Novos táxons de fungos presentes em ambientes aquáticos descritos a partir de 2010 pertencentes as classes dos Sordariomycetes e Dothideomycetes.

Continentes	País	Sordariomycetes	Dothideomycetes	Autor
África	Egito	<i>Annulatascus nilensis</i> *	-	ABDEL-WAHAB et al. (2011)
Ásia	Tailândia	-	<i>Jahnula morakotii</i> *	SIVICHAI; BOONYUEN (2010)
	Tailândia	<i>Ascothailandia grenadoidia</i> *	-	SRI-INDRASUTDHI et al. (2010)
	Tailândia	<i>Annulatascus Aquatorba</i> *	-	BOONYUEN et al. (2012)
	Tailândia		<i>Lophiostoma vaginatipora</i> *	ZHANG et al. (2014)
	China	-	<i>Conlarium duplumascospora</i> **	LIU et al. (2012)
	China	<i>Jobellisia guangdongensis</i> *	-	LIU et al. (2012)
	China	<i>Annulatascus menglensis</i> *	-	HU et al. (2012)
	China	<i>Aqualignicola vaginata</i> *	-	HU et al. (2012)
América do Norte	EUA	<i>Longicollum biappendiculatum</i> **	-	ZELSKI et al. (2011a)
	EUA	-	<i>Alascospora evergladensis</i> **	RAJA; VIOLI; SHEARER (2010)
	EUA	-	<i>Minutisphaera fimbriatipora</i> **	FERRER; MILLER; SHEARER (2011)
	EUA	-	<i>Lindgomyces angustiascus</i> *	RAJA et al. (2013)
América Central	Costa Rica	-	<i>Natipusilla limonesnis</i> *	FERRER; MILLER; SHEARER (2011)
	Costa Rica	<i>Longicollum biappendiculatum</i> *	-	ZELSKI et al. (2011a)
	Costa Rica	<i>Bullimyces communis</i> **	-	FERRER et al. (2012)
	Costa Rica	<i>Bullimyces costaricensis</i> **	-	FERRER et al. (2012)
	Costa Rica	<i>Bullimyces aurisporus</i> **	-	FERRER et al. (2012)
	Costa Rica	<i>Riomyces rotundus</i> **	-	FERRER et al. (2012)
	Costa Rica	<i>Hydromelitis pulchella</i> **	-	FERRER et al. (2012)
	Costa Rica	<i>Torrentispora pilosa</i> *	-	BARBOSA et al. (2013)
	Costa Rica	<i>Vertexicola ascoliberatus</i> *	-	BARBOSA et al. (2013)
América do Sul	Peru	<i>Longicollum biappendiculatum</i> *	-	ZELSKI et al. (2011a)
	Peru	<i>Chaetorostrum quincemilensis</i> *	-	ZELSKI et al. (2011b)
	Peru	-	<i>Natipusilla bellaspora</i> *	RAJA; MILLER; SHEARER (2012)
	Peru	<i>Conioscypha peruviana</i> *	-	ZELSKI et al. (2015)
	Equador	-	<i>Natipusilla decorospora</i> *	FERRER; MILLER; SHEARER (2011)
	Equador	-	<i>Natipusilla naponensis</i> *	FERRER; MILLER; SHEARER (2011)
	Brasil	<i>Longicollum biappendiculatum</i> *	-	ZELSKI et al. (2011a)
	Brasil	<i>Torrentispora pilosa</i> *	-	BARBOSA et al. (2013)
	Brasil	<i>Vertexicola ascoliberatus</i> *	-	BARBOSA et al. (2013)

\*\* = Gênero e espécie nova

\* = Espécie nova



### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-WAHAB, M. A et al. *Annulatascus nilensis* sp. nov., a new freshwater ascomycete from the River Nile, Egypt. **IMA fungus**, v. 2, n. 1, p. 1–6, jun. 2011.
- APRILE, F. et al. Application of Hydrological and Limnological studies on Building Model for Water circulation of Meromictic Black Water Lakes at the Central. **International Research Journal of Environment Sciences**, v. 2, n. 7, p. 58–63, 2013.
- AVILA-CABADILLA, L. D. et al. Composition, structure and diversity of phyllostomid bat assemblages in different successional stages of a tropical dry forest. **Forest Ecology and Management**, v. 258, n. 6, p. 986–996, set. 2009.
- BARBOSA, F. R. et al. New species and new records of freshwater ascomycetes from Brazil and Costa Rica. **Mycologia**, v. 105, n. 2, p. 335–43, 2013.
- BARLOCHER, F. Reproduction and dispersal in aquatic hyphomycetes. **Mycoscience**, p. 3–8, 2009.
- BOONYUEN, N. et al. *Annulatascus aquatorba* sp. nov., a lignicolous freshwater ascomycete from Sirindhorn Peat Swamp Forest, Narathiwat, Thailand. **Mycologia**, v. 104, n. 3, p. 746–57, 2012.
- DONG, J.-Y. et al. Colomitides A and B: novel ketals with an unusual 2,7-dioxabicyclo[3.2.1]octane ring system from the aquatic fungus YMF 1.01029. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1216–23, ago. 2009.
- FERRER, A. et al. Three new genera representing novel lineages of Sordariomycetidae (Sordariomycetes, Ascomycota) from tropical freshwater habitats in Costa Rica. **Mycologia**, v. 104, n. 4, p. 865–79, 2012.
- FERRER, A.; MILLER, A. N.; SHEARER, C. A. *Minutisphaera* and *Natipusilla*: two new genera of freshwater Dothideomycetes. **Mycologia**, v. 103, n. 2, p. 411–23, 2011.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. Pt 5, p. 509–47, maio 2007.
- HORBE, A. M. C.; OLIVEIRA, L. G. DE S. Química de igarapés de água preta do nordeste do Amazonas - Brasil. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 753–760, 2008.
- HU, D. et al. Fungal diversity on submerged wood in a tropical stream and an artificial lake. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, n. 13, p. 3799–3808, 6 out. 2010.
- HU, D.-M. et al. Two new freshwater species of Annulatascaceae from China. **Mycotaxon**, v. 120, p. 81–88, 2012.
- JONES, E. B. G.; PANG, K.-L. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2403–2423, 26 nov. 2012.

- KIRK, P. M. et al. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. Tenth ed. Trowdbridge: CAB International, 2008. p. 72
- KRAUSS, G.-J. et al. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 4, p. 620–51, jul. 2011.
- KUMAR, T. K. A. et al. Orbilia ultrastructure, character evolution and phylogeny of Pezizomycotina. **Mycologia**, v. 104, n. 2, p. 462–76, 2012.
- LIU, F.; HU, D.-M.; CAI, L. *Conlarium duplumascospora* gen. et. sp. nov. and *Jobellisia guangdongensis* sp. nov. from freshwater habitats in China. **Mycologia**, v. 104, n. 5, p. 1178–86, 2012.
- MENDONÇA, F.; MAGNUSSON, W.; ZUANON, J. Relationships Between Habitat Characteristics and Fish Assemblages in Small Streams of Central Amazonia. **American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, v. 2005, n. 4, p. 751–764, 2005.
- MONTEIRO, J. S.; GUSMAO, L. F. P. Two new species of *Ceratosporella* (anamorphic fungi) from Brazilian Amazon forest. **Nova Hedwigia**, v. 98, n. January, p. 481–490, 2014.
- MONTEIRO, J. S.; GUSMÃO, L. F. P.; CASTAÑEDA-RUIZ, R. F. Two new microfungi from Brazilian Amazon Forest: *Atrogeniculata submersa* and *Nigrolentilocus amazonicus*. **Mycotaxon**, v. 127, p. 39–45, 2014.
- NUNES, M. V.; FERREIRA, M. J.; REGINATO, R. Estudo das diferenças das variáveis abióticas de um riacho de pequena ordem e de uma represa. **Fórum Ambiental**, v. 9, p. 351–359, 2013.
- PEARMAN, J.; TAYLOR, J.; KINGHORN, J. Fungi in aquatic habitats near St Andrews in Scotland. **Mycosphere**, v. 1, n. 2010, p. 11–21, 2010.
- PFISTER, D. H. **Systematics and Evolution: 2 Pezizomycotina: Pezizomycetes, Orbiliomycetes**. 2<sup>o</sup>. ed. Berlin: [s.n.]. p. 260
- PINTO, A. G. N. et al. Efeitos da contribuicao antropica sobre as aguas do rio negro, na cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Caminhos de Geografia**, v. 10, n. 29, p. 26–32, 2009.
- QUEIROZ, M. M. A. et al. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 943–952, 2009.
- RAJA, H. A.; SCHMIT, J. P.; SHEARER, C. A. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 2, p. 419–455, 18 out. 2009.
- RAJA, H. A.; VIOLI, H. A.; SHEARER, C. A. Freshwater ascomycetes: *Alascospora evergladensis*, a new genus and species from the Florida Everglades. **Mycologia**, v. 102, n. 1, p. 33–38, 29 jul. 2010.

RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; SHEARER, C. A. Freshwater ascomycetes: Natipusillaceae, a new family of tropical fungi, including *Natipusilla bellaspora* sp. nov. from the Peruvian Amazon. **Mycologia**, v. 104, n. 2, p. 569–73, 2012.

RAJA, H. A. et al. *Lindgomyces angustiascus*, (Lindgomycetaceae, Pleosporales, Dothideomycetes), a new lignicolous species from freshwater habitats in the USA. **Mycoscience**, v. 54, n. 5, p. 353–361, set. 2013.

SALATI, E.; SANTOS, A. A.; KLABIN, I. S. K. Temas ambientais relevantes. **Estudos avançados**, v. 20, n. 56, p. 107–127, 2006.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. O papel dos fungos nos Ecosystemas Aquáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 36, n. 1, p. 26–30, 2007.

SHEARER, C. A. et al. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 49–67, 27 out. 2007.

SHEARER, C. A et al. The molecular phylogeny of freshwater Dothideomycetes. **Studies in mycology**, v. 64, p. 145–153S4, jan. 2009.

SHEARER, C. A. et al. Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. **Biodiversity and Conservation**, p. 1877–1897, 20 mar. 2015.

SHEARER, C. A.; LANGSAM, D. M.; LONGCORE, J. E. Fungi in freshwater habitats. In: MUELLER GM, B.; GF, F. M. (Eds.). **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier, 2004. p. 513–531.

SHEARER, C. A.; RAJA, H. A. **Freshwater Ascomycetes Database**. Disponível em: <<http://fungi.life.illinois.edu/>>. Acesso em: 13 out. 13C.

SIMONIS, J. L.; RAJA, H. A.; SHEARER, C. A. Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in fresh water? **Fungal Diversity**, v. 31, p. 135–146, 2008.

SIVICHAI, S.; BOONYUEN, N. *Janula morakotii* sp. nov. and *J. appendiculata* from a peat swamp in Thailand. **Mycotaxon**, v. 112, p. 475–481, 2010.

SPATAFORA, J. W. et al. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1018–28, 2006.

SRIDHAR, K. R.; KARAMCHAND, K. S.; HYDE, K. D. Wood-inhabiting filamentous fungi in 12 high-altitude streams of the Western Ghats by damp incubation and bubble chamber incubation. **Mycoscience**, p. 104–115, 2010.

SRI-INDRASUTDHI, V. et al. Wood-inhabiting freshwater fungi from Thailand: *Ascothailandia grenadoidia* gen. et sp. nov., *Canalisporium grenadoidia* sp. nov. with a key to *Canalisporium* species (Sordariomycetes, Ascomycota). **Mycoscience**, p. 411–420, 2010.

- THOMAZ, S. M.; BINI, L. M.; BOZELLI, R. L. Floods increase similarity among aquatic habitats in river-floodplain systems. **Hydrobiologia**, v. 579, n. 1, p. 1–13, 21 nov. 2006.
- VIJAYKRISHNA, D.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. Molecular taxonomy , origins and evolution of freshwater ascomycetes. **Fungal Diversity**, p. 351–390, 2006.
- WALKER, I. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters : Stabilization of biodiversity ? Bacia do Rio Negro. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 617–626, 2009.
- ZELSKI, S. E. et al. *Longicollum biappendiculatum* gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete from the Neotropics. **Mycosphere**, v. 5, n. 2, p. 539–545, 2011a.
- ZELSKI, S. E. et al. *Chaetorostrum quincemilensis*, gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete and its *Taeniolella*-like anamorph from Peru. **Mycosphere**, v. 2, n. 5, p. 593–600, 10 out. 2011b.
- ZELSKI, S. E. et al. *Conioscypha peruviana* sp. nov., its phylogenetic placement based on 28S rRNA gene, and a report of *Conioscypha gracilis* comb. nov. from Peru. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 319–325, maio 2015.
- ZHANG, H. et al. Freshwater ascomycetes: *Lophiostoma vaginatispora* comb. nov. (Dothideomycetes, Pleosporales, Lophiostomaceae) based on morphological and molecular data. **Phytotaxa**, v. 176, n. 1, p. 184–191, 2014.
- ZHANG, N. et al. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1076–87, 2006.
- ZHANG, Y. et al. *Pseudorbilia* gen. nov. (Orbiliaceae) from Yunnan, China. **Fungal Diversity**, n. 2006, p. 305–312, 2007.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

- ✓ Investigar a influência da sazonalidade e do modo de coleta na diversidade de fungos decompositores de madeira submersa de ambientes aquáticos da região Amazônica.

### 4.2 Específicos

- ✓ Descrever a diversidade de fungos decompositores de madeiras submersas em ambientes aquáticos da Região Amazônica;
- ✓ Avaliar a riqueza, diversidade e equitabilidade das comunidades de fungos presentes em madeiras submersas;
- ✓ Comparar a diversidade dos fungos encontrados durante as estações não chuvosa e chuvosa;
- ✓ Investigar a posição filogenética do táxon *Longicollum biappendiculatum* e
- ✓ Avaliar a metodologia de “iscas de madeira” para a descrição da diversidade fúngica.

## 5. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Os materiais, metodologias, resultados e discussões dessa presente tese estão apresentados na forma de capítulos:

**Capítulo 1** – Apresenta “Comparação da comunidade de fungos de água doce durante a estação não chuvosa e chuvosa em um pequeno lago de água preta no Amazonas, Brasil”. Esse capítulo foi formatado na forma de artigo e publicado no *International Journal of Food, Agriculture and Environment*, Vol.14 (2):156-161 (2016).

**Capítulo 2** – Apresenta “Posição filogenética de *Longicollum biappendiculatum* com base no DNAr das regiões ITS e 28S de indivíduos isolados a partir de madeira submersa do Peru e Brasil”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo que será submetido a publicação no periódico *Mycotaxon, International Journal of Fungal Taxonomy and nomenclature*;

**Capítulo 3** – Apresenta “Avaliação do método de iscas de madeira para investigação da diversidade de fungos presentes em madeira submersa e em decomposição no igarapé Tarumã Açu, Manaus, Amazonas, Brasil”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo que será submetido a publicação no periódico *Mycosphere – Journal of Fungal Biology*.

## 6. CAPÍTULO 1

### **COMPARAÇÃO DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE ÁGUA DOCE DURANTE A ESTAÇÃO NÃO CHUVOSA E CHUVOSA EM UM PEQUENO LAGO DE ÁGUA PRETA NO AMAZONAS, BRASIL**

Cortez ACA<sup>1,2</sup>, Sanches MA<sup>3</sup>, Zelski SE<sup>4,5</sup>, Souza JVB<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-97, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia – BIONORTE – Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF – Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>4</sup>Illinois Natural History Survey, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL 61820

<sup>5</sup>Department of Plant Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Room 265 Morrill Hall, 505 South Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801

#### **RESUMO**

Fungos de água doce são importantes decompositores de madeira e material orgânico submersos nos ecossistemas aquáticos. Este estudo comparou a biodiversidade da comunidade fúngica durante a estação não chuvosa e chuvosa em um pequeno lago de água preta no Amazonas, Brasil. Foram realizadas quatro coletas de madeira submersa (maio, agosto e

novembro de 2013, e fevereiro de 2014). Para cada coleção, 30 fragmentos de madeira foram coletados e examinados microscopicamente quanto a presença fungos. Um total de 264 fungos foram observados e distribuídos em 25 táxons, dos quais 16 foram ascomicetos meiospóricos e 9 mitospóricos. O índice de diversidade Shannon-Weaver ( $H'$ ) foi maior nos meses chuvosos ( $H'= 2,6012$ ) que nos meses não chuvosos ( $H'= 2,1296$ ). Quando as comunidades da estação chuvosa e não chuvosa foram comparadas, por meio do índice de similaridade de Sorensen ( $S'$ ), obteve-se um índice de 0,6842. Este estudo mostra que, as madeiras em decomposição no ambiente lótico estudado apresentaram uma biodiversidade fúngica rica, equilibrada e que sofre influência da sazonalidade (estação chuvosa e não chuvosa).

**Palavras chave:** Amazônia, Decomposição, Diversidade, Ascomicetos de água doce, Madeira

## **Introdução**

Fungos aquáticos são importantes decompositores de material orgânico submerso em ecossistemas aquáticos. Eles são importantes para a cadeia alimentar como fonte de alimento para vertebrados, invertebrados e outros fungos <sup>1</sup>, e podem ser encontrados em diferentes ambientes aquáticos, como oceanos e águas continentais <sup>2,3</sup>. Os ecossistemas aquáticos continentais podem ser divididos em três classes: a) lóticos - representado por rios, riachos, córregos e lençóis freáticos; b) lênticos - composta de lagos, pântanos e lagoas; e c) híbridos ou artificiais - represas ou reservatórios <sup>3,4</sup>. A Amazônia Brasileira é rica em ambientes continentais lóticos e lênticos, no entanto, pouco se conhece sobre a diversidade dos fungos presentes nesses ambientes, bem como, sabe-se pouco sobre a influência da sazonalidade regional sobre a diversidade desses.



Estudos sobre a composição de fungos de água doce têm sido feitos ao longo dos últimos 50 anos<sup>5,6</sup>. Aproximadamente 3.050 táxons de fungos já foram relatados em habitats aquáticos (água doce e oceânicas). Os táxons encontrados nesses habitats pertencem aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Chytridiomycota<sup>2</sup>. Sendo que, o filo Ascomycota destaca-se pois agrupa em três importantes classes (Dothideomycetes, Orbiliomycetes e Sordariomycetes) os fungos mais comumente encontrados<sup>1,7</sup>.

A maioria dos estudos, de países de climas temperados, foram realizados na América do Norte, Europa, Sudeste Asiático e no Reino Unido<sup>5,7</sup>. Em climas tropicais, os estudos foram realizados na Ásia e na Austrália<sup>8-12</sup>. A América do Sul é uma área geográfica pouco estudada, sendo que, alguns poucos trabalhos podem ser citados (Zelski et al.<sup>13-16</sup>, Ferrer et al.<sup>17</sup>, Raja et al.<sup>18</sup> e Shearer et al.<sup>7</sup>) e, especificamente no Brasil, destacam-se os trabalhos realizados por Barbosa et al.<sup>19-21</sup>, Monteiro e Gusmão<sup>22</sup> e Schoenlein-Crusius et al.<sup>23,24</sup>.

A Amazônia é composta pela maior floresta tropical, maior bacia de água doce e maior biodiversidade do mundo<sup>25</sup>. Teoricamente, o seu clima, quente e úmido, favorece a proliferação de microrganismos, no entanto, em contraste, poucos estudos foram realizados descrevendo a sua diversidade fúngica<sup>26,27</sup>.

Os ecossistemas aquáticos da bacia amazônica são compostos pelas águas brancas e pretas. As águas brancas têm uma elevada quantidade de material em suspensão e são tipicamente neutras com um pH ~7<sup>28</sup>. Por sua vez, as águas pretas são pobres em nutrientes, oxigênio dissolvido e são ácidas com o pH ~ 4<sup>29</sup>. Nessas últimas, estudos existentes demonstram que, os fungos aquáticos são importantes na decomposição de material vegetal alóctone e autóctone, fornecendo uma fonte de energia na base da cadeia alimentar<sup>30</sup> apoiando a biodiversidade em níveis tróficos superiores<sup>25,31</sup>.

Mesmo com o importante papel ecológico desempenhado pelos fungos de água doce, ainda há poucos trabalhos que descrevem a diversidade, ecologia e distribuição desses

organismos na Amazônia. Estudos são necessários a fim de compreender a função e a importância destes organismos, especialmente, nas águas pretas, antes destes habitats serem alterados ou destruídos. O presente trabalho teve por finalidade descrever e comparar as comunidades de fungos durante a estação não chuvosa e chuvosa em um pequeno lago de água preta no Amazonas, Brasil. Os objetivos do estudo foram: A) Quantificar o número dos diferentes táxons presentes no período chuvoso e não chuvoso; B) Identificar a maior quantidade de táxons possível; e C) Comparar a composição da comunidade de fungos entre os dois períodos.

### **Material e métodos**

**Área de estudo:** As amostras (fragmentos de madeira em decomposição) foram coletadas em um lago conhecido como "Parque das Águas San Rafael" (3°16'35"S, 60° 26'87"W), localizado na estrada de Iranduba ~ 25 km, Amazonas, Brasil. A origem desse lago veio do represamento de um rio para construir uma auto-estrada (AM-70) nos anos 70. Nesse local o clima é quente e úmido, com temperatura de 25 °C e precipitação média de 2.300 mm. O período chuvoso ocorre de dezembro a maio e o não chuvoso de junho a novembro <sup>32</sup>. O lago estudado é classificado como sendo "lago de terras altas" (não sofre influência das inundações de rios) e, seu volume, é relativamente constante ao longo do ano.

**Caracterização de água:** A coloração da água do "Parque das Águas San Raphael" apresentou-se marrom escura (característica da região) e com baixa turbidez. Dessa forma, o lago se mostrou um local adequado para coleta de amostras de madeiras submersas. Para caracterização dos parâmetros físico-químicos da água, foram coletados dados de temperatura (°C), pH, condutividade elétrica ( $\mu$ S), transparência (m), concentração de oxigênio (mg / L) e potencial de saturação (%). Estes parâmetros foram medidos com uma sonda multiparamétrica Proflin 197i WTW (Wellheim, Alemanha).

**Coleta das amostras:** Uma das coletas foi realizada no final da estação chuvosa (maio, 2013), duas foram realizadas durante a estação não chuvosa (agosto e novembro, 2013) e uma outra no início da estação chuvosa (fevereiro 2014). Em cada coleta, 30 pedaços de madeira em decomposição foram obtidos. As amostras foram selecionadas, transportadas e armazenadas como descrito por Shearer et al. <sup>33</sup>, resumidamente, pedaços de madeira, submersos, em decomposição e de tamanho ente 6-22 cm de comprimento e 4-15 cm de diâmetro foram coletados e transportados (em sacos plásticos lacrados) ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. No laboratório, as amostras foram lavadas com água corrente, colocadas em câmaras úmidas (caixas de plástico, revestidas com toalhas de papel úmidas) e incubadas à temperatura ambiente.

**Identificação morfológica e isolamento de fungos em meio de cultura:** Semanalmente, ao longo de seis meses, as amostras de madeira foram examinadas quanto a presença de estruturas reprodutivas de fungos usando um estereomicroscópio Stemi DV4 (Zeiss, Alemanha). As estruturas reprodutivas visualizadas foram transferidas, com o auxílio de agulhas, para lâminas de microscopia que continham água destilada e submetidas a análise microscópica usando o microscópio AxiosKop 40 (Zeiss, Germany). Os indivíduos encontrados foram classificados em táxons com base no tipo de conidiogêneses, morfologia dos conidióforos e dos conídios <sup>34</sup>. Quando possível, ascósporos ou conídios germinados foram transferidos para o meio de cultura Ágar Água (20 g de ágar/L e cloranfenicol a 250 mg/L) e as culturas formadas foram então transferidas para Ágar peptona extrato de levedura e glicose (peptona a 1,25 g / L, extrato de levedura 1,25 g / L, glicose a 5 g / L, cloranfenicol 250 mg / L e ágar 18 g / L) <sup>33</sup>. As informações dos aspectos macromorfológicos das colônias formadas foram utilizadas na avaliação taxonômica<sup>34</sup>.

**Análise de dados:** No presente estudo, o conceito de indivíduo foi “unidade de vida que se manifesta em um certo local”. O conceito de táxon foi o agrupamento de indivíduos morfológicamente ou filogeneticamente similares e o conceito de táxons foi o de o plural de táxon.

A frequência, a riqueza (números de táxons), diversidade biológica e a semelhança das comunidades foram calculadas para cada estação (chuvosa e não chuvosa).

Para caracterizar a diversidade da comunidade de fungos foi empregado o índice de Shannon-Weaver ( $H'$ )<sup>35</sup>. Quanto mais alto esse índice maior heterogeneidade e diversidade. A fórmula abaixo foi usada para realizar estes cálculos:

$$H' = -\sum (p_i) * (\ln . p_i)$$

$$\text{Onde } p_{in} = \frac{n_i}{N}$$

$n_i$  = é o número individual da  $i$ -ésima táxon.

$N$  = o número individual de todos os táxons.

O índice de equitabilidade ( $E$ ) também foi calculado<sup>36</sup>. Este índice representa a uniformidade do número de indivíduos por táxon. A equitabilidade tende para 0 quando um táxon domina a comunidade, e se aproxima de 1, quando todos os táxons têm a mesma abundância. O índice é expresso pela seguinte fórmula:

$$E = H' / \ln S$$

Onde:

$H'$  = é o índice de Shannon-Weaver baseado no número de indivíduos

$S$  = é o número de táxons presentes na amostra

Para avaliar as diferenças entre as comunidades de fungos na estação chuvosa e não chuvosa, foi calculado o índice de similaridade Sorensen ( $S'$ ), com valores que variam de 0

(nenhuma semelhança) a um (similaridade absoluta). Este índice foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$S' = \frac{2c}{a + b}$$

Onde:

a = o número total de táxons coletados na condição A

b = o número total de táxons coletados na condição B

c = número de táxons comum em ambas as condições.

Uma curva de acumulação do número de novos táxons por número de amostras coletadas foi elaborada. Essa curva permitiu avaliar se o esforço de amostragem realizado foi significativo para descrever a diversidade <sup>37</sup>.

## **Resultados**

A fim de caracterizar o local de estudo, foram realizadas análises físico-químicas das amostras de água durante a estação chuvosa e a estação não chuvosa. Como pode ser observado na Tabela 1, as condições foram semelhantes em ambas as estações.

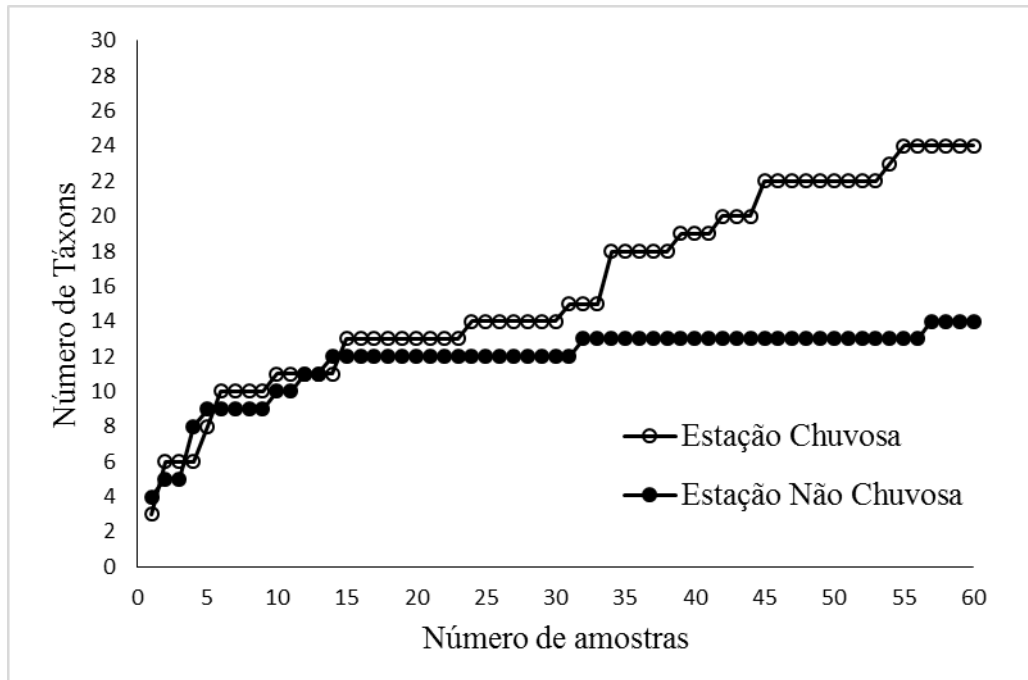
**Tabela 1** – Características físico-químicas da água do "Parque das Águas San Raphael" em Iranduba-Amazonas-Brasil durante a estação chuvosa e não-chuvosa.

<b>Período</b>	<b>Estação Chuvosa*</b>	<b>Estação Não Chuvosa**</b>
Temperatura da água (°C)	28,2 ± 0,1	28,9 ± 0,1
pH	4,2 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Condutividade elétrica (µS)	8,0 ± 0,1	8,1 ± 0,1
Transparência (m)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
O <sub>2</sub> total (mg/L)	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1
Potencial de saturação (%)	55 ± 2	67 ± 1

\* Maio 2013 e Fevereiro 2014.

\*\* Agosto 2013 e Novembro 2013

Com a finalidade de verificar se o tamanho da amostragem foi suficiente para descrever a diversidade do lago nas diferentes estações, foi determinada a razão entre o número de novos táxons e número amostras de madeira. Na curva de acumulação de táxons (Figura 1), observou-se que, na estação não chuvosa, a diversidade foi estabelecida após 15 amostras e, enquanto que, na estação chuvosa, mesmo após 35 amostras, novos táxons continuaram surgindo.



**Figura 1** – Curva de acumulação do número de táxons de fungos em relação ao esforço amostral de coleta de fragmentos de madeira, em decomposição e submersas, no Lago "Parque das Águas San Raphael", em Iranduba-Amazonas-Brasil. Amostras de madeiras coletadas períodos de maio, agosto e novembro de 2013 e fevereiro 2014.

Nas 120 amostras de madeira foram observados 264 fungos, esses que puderam ser sistematizados em 25 táxons (16 fungos meiospóricos e 9 mitospóricos). Na Tabela 2 estão descritos os táxons e as suas abundâncias relativas em ambos os períodos sazonais investigados.

Nas coletas, realizadas na estação chuvosa, foram observados 130 indivíduos que puderam ser sistematizados em 24 táxons. Entre os táxons meiospóricos (número total = 15), nove puderam ser identificados a nível de gênero. Quanto aos táxons mitospóricos (n total = 9), todos puderam ser identificados a nível de gênero, exceto o táxon Mitospóricos sp. AMMI01. Os táxons não identificados representam potenciais novas espécies fúngicas ainda não descritas na literatura. Dez táxons, identificados a nível de gênero, foram exclusivamente observados na estação chuvosa. Entre esses, três táxons meiospóricos (*Ascotaiwania* sp. Sivan & HS Chang, *Lasiosphaeria* sp. Cesati & Notaris e *Flammispora*-like AMME13) e sete

táxons mitospóricos (*Brachydesmiella* sp. Arnaud & Hughe, *Brunneodinemasporium brasiliensis* Crous & RF Castañeda, *Chloridium* sp. ligação, *Dactylella* sp. Grove, *Dendrostilbella* sp. Höhn., *Pseudobotrytis terrestris* (Timonin) Subramanian e *Thozetella* sp. Kuntze) (Tabela 2).

Durante a estação não chuvosa, 134 indivíduos foram observados e puderam ser sistematizados em 14 táxons (12 fungos meiospóricos e 2 mitospóricos). Entre os táxons, apenas um foi exclusivo para este período (Não Identificado Sordariomycetes sp. AMME09). Os táxons *Spinulospora pucciniophila* Deighton e o não identificado Mitospóricos sp. AMMI01 foram encontrados simultaneamente nas estações chuvosa e não-chuvosa.

Os índices de riqueza, diversidade e equitabilidade dos indivíduos coletados na estação chuvosa e na estação não chuvosa estão demonstrados na Tabela 3.

Na estação chuvosa, os índices de diversidade (H') e equitabilidade (E) foram 2,6012 e 0,561663, respectivamente. Nessa estação, 3 dos 5 táxons predominantes foram fungos meiospóricos (Não identificado Dothideomycetes sp. AMME01, Annulatasceae-like sp. nov. AMME12 e não identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME04). Na estação não chuvosa, o índice de diversidade (H') foi de 2,1296 e equitabilidade (E) de 0,600822. Nessa estação, os táxons meiospóricos mais frequentes foram: Não identificado Dothideomycetes AMME01, *Longicollum biappendiculatum* Zelski, F.R. Barbosa, Raja, A.N. Mill & Shearer, não identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME07, não identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME04 e *Aquaticola* sp. Ho, K.M. Tsui, Hodgkiss & K.D. Hyde. O índice de similaridade de Sorensen entre as duas estações investigadas foi 0,6842 (Tabela 3).



**Tabela 2** – Número e abundância relativa (%) dos táxons de fungos, presentes nas amostras de madeira em decomposição, coletadas no Lago "Parque das Águas San Raphael" (Iranduba-Amazonas-Brasil), nas estações chuvosa e não chuvosa.

Táxons	Estação Chuvosa Maio 2013/Fev 2014		Estação Não Chuvosa Agost/Nov 2013	
		%		%
<b>Ascomycetes</b>				
Não Identificado Dothideomycetes sp. nov. AMME01	27	20,9	40	29,9
<i>Spinulospora pucciniophila</i> Deighton	19	14,7	10	7,4
Não Identificado Mitospórico sp. AMMI01	17	13,0	2	1,5
Annulatascaceae-like sp. nov. AMME12	9	7,0	5	3,7
Não Identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME04	7	5,4	7	5,2
<i>Brunneodinemasporium brasiliensis</i> Crous & R.F. Castañeda	6	4,6	0	0
Não Identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME07	5	3,8	19	14,3
Não Identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME08	5	3,8	5	3,7
<i>Flammispora</i> - like AMME13	4	3,0	0	0
<i>Longicollum biappendiculatum</i> Zelski, F.R. Barbosa, Raja, A.N. Mill & Shearer	4	3,0	26	19,5
<i>Thozetella</i> sp. Kuntze	4	3,0	0	0
<i>Chloridium</i> sp. Link	3	2,3	0	0
<i>Dendrostilbella</i> sp. Höhn.	3	2,3	0	0
<i>Dactylella</i> sp. Grove	2	1,6	0	0
<i>Fluviatispora reticulata</i> K.D. Hyde	2	1,6	1	0,7
<i>Natipusilla</i> sp. Ferrer, A.N. Mill. & Shearer	2	1,6	4	3,0
<i>Potamomyces armatisporus</i> K.D. Hyde	2	1,6	1	0,7
<i>Brachydesmiella</i> sp. Arnaud & Hughe	2	1,6	0	0
<i>Aquaticola</i> sp. Ho, K.M. Tsui, Hodgkiss & K.D. Hyde	2	1,6	7	5,2
<i>Ascotaiwania</i> sp. Sivan. & H. S. Chang	1	0,7	0	0
<i>Lasiosphaeria</i> sp. Cesati & Notaris.	1	0,7	0	0
<i>Pseudobotrytis terrestris</i> (Timonin) Subram.	1	0,7	0	0
Annulatascaceae-like AMME03	1	0,7	0	0
Annulatascus-like AMME10	1	0,7	5	3,7
Não Identificado Sordariomycetes sp. AMME09	0	0	2	1,5
Total	130	100	134	100

**Tabela 3.** Comparação da diversidade de fungos presentes em amostras de madeira submersas coletadas, nas estações chuvosa e não chuvosa, no Lago "Parque das Águas San Raphael" (Iranduba-Amazonas-Brasil).

<b>Período</b>	<b>Estação Chuvosa Maio 2013/ Fevereiro 2014</b>	<b>Estação Não Chuvosa Agosto /Novembro 2013</b>
<b>Tamanho de amostras</b>	60	60
<b>Número de Ascomicetos (meiospóricos)</b>	73	122
<b>Número de Ascomicetos (mitospóricos)</b>	57	12
<b>Número de táxons por amostra nas estações</b>	2,16	2,23
<b>Táxons únicos</b>	5	2
<b>Sobreposição de táxons nas duas estações</b>		13
<b>Cinco táxons mais comuns</b>	Não Identificado Dothideomycetes sp. nov. AMME01 (20,9 %) <i>Spinulospora pucciniophila</i> (14,7 %) Não Identificado Mitospórico sp. AMMI01 (13,0%) Annulatascaceae-like sp. nov. AMME12 (7,0 %) Não Identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME04 (5,4 %)	Não Identificado Dothideomycetes sp. nov. AMME01 (29,9 %) <i>Longicollum</i> <i>biappendiculatum</i> (19,5 %) Não Identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME07 (14,3%) <i>Spinulospora pucciniophila</i> (7,4 %) Não Identificado Sordariomycetes sp. nov. AMME04 and <i>Aquaticola</i> sp. (5,2 %)
<b>Riqueza (R)</b>	24	14
<b>Shannon-Weaver (H')</b>	2,6012	2,1296
<b>Equitabilidade (E)</b>	0,561663	0,600822
<b>Sorensen (S ')</b>	0,6842	

## Discussão

As amostras de água do "Parque das Águas San Raphael" apresentaram características físico-químicas semelhantes as observadas nas amostras de água de pequenos lagos e rios de águas prestas da região amazônica<sup>29,38-40</sup>. Essas últimas apresentam águas ácidas (pH ~ 4), que possuem baixa condutividade elétrica e pouco material particulado em suspensão. Estas características físico-químicas foram semelhantes nas estações não chuvosa e chuvosa. Isso sugere que, no presente trabalho, as características físico-química investigadas não foram responsáveis pelas diferenças de diversidades observadas nas diferentes estações.

Nas amostras investigadas no presente estudo, 25 táxons foram observados, sendo que, 16 desses eram fungos meiospóricos e 9 mitospóricos. Número de táxons semelhante foi descrito compondo a diversidade de amostras de madeira de um lago na Tailândia (Hu et al.<sup>12</sup>). Por outro lado, trata-se de um número de táxons inferior ao descrito em lagos naturais de estudos realizados na China, Austrália e Flórida<sup>5,8-10</sup>. Essa diferença, ocorre possivelmente, porque os lagos com maior idade apresentam maior diversidade, no entanto, devido a complexidade de variáveis associadas a essa questão, mais estudos necessitam ser realizados.

No presente estudo, três táxons meiospóricos encontrados (*Ascotaiwania* sp, *Annulatascus*-like AMME10 e *Lasiosphaeria* sp.) foram previamente descritos em estudos realizados na China<sup>9,10</sup> e cinco táxons meiospóricos (*Ascotaiwania* sp., *Annulatascus*-like AMME10, *Flammispora*-like AMME13, *Fluviatispora reticulata* e *Longicollum biappendiculatum*) e 1 mitospórico (*Thozetella* sp.) foram previamente descritos em um estudo realizado na Florida-USA<sup>5</sup>.

Uma maior diversidade ( $H' = 2,6012$ ) foi observada na estação chuvosa, nessa estação os táxons mais frequentes foram: o não identificado *Dothideomycetes* sp. AMME01 (20,9 %), *Spinulospora pucciniophila* (14,7 %) e o não identificado Mitospóricos sp. AMMI01 (13,0

%). Quando as estações foram comparadas, o índice de similaridade Sorensen foi de 0,6842, resultante da sobreposição de 13 táxons. No entanto, a estação chuvosa apresentou 11 táxons a mais que a estação não-chuvosa. Uma possível explicação para essa maior diversidade na estação chuvosa é que, as águas das precipitações da estação chuvosa carregam, da vegetação circundante e do solo, para o lago, uma biodiversidade fúngica, principalmente formada de fungos mitospóricos de caráter transitório <sup>41</sup>.

Poucos estudos foram realizados descrevendo a diversidade de fungos aquáticos na Amazônia Brasileira e nenhum havia sido realizado estudando fungos aquáticos associados a madeira em decomposição. O presente trabalho aumenta o conhecimento da diversidade de fungos das águas pretas e, mostra que, a comunidade fúngica pode sofrer mudanças devido a sazonalidade. Este estudo apresenta como sugestão que sejam realizados estudos que resultem no aumento do conhecimento dos padrões de distribuição, ecologia e identificação de espécies de ascomicetos presentes em água doce no norte do Brasil.

### **Agradecimentos**

Os autores da Universidade de Illinois agradece ao MCTI pelo apoio no curso início deste projeto, e a Lemann por conceder fundos para continuar esta colaboração. Dr. Huzefa Raja, Andrew Miller e Carol Shearer agradecemos por sua colaboração. Roberto Moreira pela ajuda nas coletas muito apreciadas.

## Referências

- <sup>1</sup>Simonis, J.L., Raja, H.A. and Shearer, C.A. 2008. Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in fresh water? *Fungal Diversity*. **31**:135-146.
- <sup>2</sup>Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thorton, H.A. and Voglymayr, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*. **16**(1):49-67.
- <sup>3</sup>Jones, E.B.G. and Pang, K.L. 2012. Tropical aquatic fungi. *Biodiversity and Conservation*. **21**(9):2403-2423.
- <sup>4</sup>Nunes, M.V., Ferreira, M.J. and Reginato, R. 2013. Estudo das diferenças das variáveis abióticas de um riacho de pequena ordem e de uma represa. *Fórum Ambiental*. **9**:351-359.
- <sup>5</sup>Raja, H.A., Schmit, J.P. and Shearer, C.A. 2009. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodiversity and Conservation*. **18**(2):419-455.
- <sup>6</sup>Shearer, C.A. and Raja, H.A. Freshwater Ascomycetes Database. 2015. Available at: <http://fungi.life.illinois.edu/>. Accessed October 13, 1BC.
- <sup>7</sup>Shearer, C.A., Zelski, S.E., Raja, H.A., Schmit, J.P., Miller, A.N. and Janovec, J.P. 2015. Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. *Biodiversity and Conservation*. **24**:1877-1897.
- <sup>8</sup>Hyde, K.D. and Goh, T. 1998. Fungi on submerged wood in Lake Barrine, north Queensland, Australia. *Mycol Res*. **102**:739-749.
- <sup>9</sup>Cai, L., Tsui, C.K.M., Zhang, K. and Hyde, K.D. 2002. Aquatic fungi from Lake Fuxian, Yunnan, China. *Fungal Diversity*. **9**:57-70.
- <sup>10</sup>Luo, J., Yin, J., Cai, L., Zhang, K. and Hyde, K.D. 2004. Freshwater fungi in Lake Dianchi , a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Diversity*. **16**:93-112.
- <sup>11</sup>Hu, D., Cai, L., Chen, H., Bahkali, A.H. and Hyde, K.D. 2010. Four new freshwater fungi associated with submerged wood from Southwest Asia. *Sydowia*. **62**(2):191-203.
- <sup>12</sup>Hu, D., Cai, L., Chen, H., Bahkali, A.H. and Hyde, K.D. 2010. Fungal diversity on submerged wood in a tropical stream and an artificial lake. *Biodiversity and Conservation*. **19**(13):3799-3808.
- <sup>13</sup>Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N., Barbosa, F.R., Gusmão, L.F.P. and Shearer, C.A. 2011. *Longicollum biappendiculatum* gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete from the Neotropics. *Mycosphere*. **2**(5):539-545.
- <sup>14</sup>Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2011. *Chaetorostrum quincemilensis*, gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete and its *Taeniolella*-like anamorph from Peru. *Mycosphere*. **2**(5):593-600.

- <sup>15</sup>Zelski, S.E., Balto, J.A., Do, C., Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2014. Phylogeny and morphology of dematiaceous freshwater microfungi from Perú. *IMA fungus*. **5**(2):425-38.
- <sup>16</sup>Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2015. *Conioscypha peruviana* sp. nov., its phylogenetic placement based on 28S rRNA gene, and a report of *Conioscypha gracilis* comb. nov. from Peru. *Mycoscience*. **56**(3):319-325.
- <sup>17</sup>Ferrer, A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2011. *Minutisphaera* and *Natipusilla*: two new genera of freshwater Dothideomycetes. *Mycologia*. **103**(2):411-23.
- <sup>18</sup>Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2012. Freshwater ascomycetes: Natipusillaceae, a new family of tropical fungi, including *Natipusilla bellaspora* sp. nov. from the Peruvian Amazon. *Mycologia*. **104**(2):569-73.
- <sup>19</sup>Barbosa, F.R., Gusmão, L.F.P., Raja, H.A. and Shearer, C.A. 2008. *Annulatascus apiculatus* sp. nov., a new freshwater ascomycete from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. *Mycotaxon*. **106**:403-407.
- <sup>20</sup>Barbosa, F.R., Gusmão, L.F.P., Raja, H.A. and Shearer, C.A. 2013. New species and new records of freshwater ascomycetes from Brazil and Costa Rica. *Mycologia*. **105**(2):335-43.
- <sup>21</sup>Barbosa, F.R., Raja, H.A., Shearer, C.A. and Gusmão, L.F.P. 2013. Some Freshwater Fungi from the Brazilian Semi-Arid Region, Including Two New Species of Hyphomycetes. *Cryptogamie, Mycologie*. **34**(3):243-258.
- <sup>22</sup>Monteiro, J.S. and Gusmão, L.F.P. 2013. An emendation of *Fusticeps* and two new species from the Brazilian Amazon Forest. *Mycotaxon*. **123**:431-437.
- <sup>23</sup>Schoenlein-Crusius, I. 2007. O Papel dos Fungos nos Ecossistemas Aquáticos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*. **36**(1):26-30.
- <sup>24</sup>Schoenlein-Crusius, I.H., Moreira, C.G. and Bicudo, D.C. 2009. Aquatic Hyphomycetes in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI, São Paulo, Brazil. *Revista Brasil Bot.* **32**(3): 411-426.
- <sup>25</sup>Eiras, J., Takemoto, R., Pavanelli, G. and Adriano, E. 2011. About the biodiversity of parasites of freshwater fish from Brazil. *Bull Eur Ass Fish Pathol*. **31**(4):161-168.
- <sup>26</sup>Rocha, O. 2003. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil-Águas doces. Projeto Estratégia Nacional da Diversidade Biológica (Bra 97 G 31). Available at: Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 70p.
- <sup>27</sup>Souza, A.Q.L., Souza, A.D.L., Astolfi Filho, S., Belém Pinheiro, M.L.P., Sarquis, M.I.M. and Pereira, J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia : *Palicourea longiflora* ( aubl .) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*. **34**(2):185-195.

- <sup>28</sup>Queiroz, M.M.A., Horbe, M.A.C., Seyler, P. and Moura, C.A.V. 2009. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil. *Acta Amazonica*. **39**(4):943-952.
- <sup>29</sup>Nascimento, C.R. and Silva, M.S.R. 2010. Alterações em parâmetros físicos e em concentrações de cátions e ânions em uma micro-bacia hidrográfica de Manaus devido a expansão urbana. *Caminhos de Geografia*. **11**(33):208-219.
- <sup>30</sup>Walker, I. 2009. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Bacia do Rio Negro*. *Acta Amazonica*. **39**(3):617-626.
- <sup>31</sup>Franco-de-Sá, J.F.O and Val, A.L. 2014. Cooper toxicity for *Scinax ruber* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura) of the Amazon: Potential of Biotic Ligand Model to predict toxicity in urban streams. *Acta Amazonica*. **44**(4):491-498.
- <sup>32</sup>Silva, M.L. and Silva, M.S.R. 2007. Hidrogeoquímica das águas subterrâneas da cidade de Iranduba (AM), Brasil. *Caminhos de Geografia*. **8**(22):87-96.
- <sup>33</sup>Shearer, C.A., Langsam, D.M. and Longcore, J.E. 2004. Fungi in freshwater habitats. In: Mueller GM B, GF FM, eds. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. San Diego: Elsevier. p. 513-531.
- <sup>34</sup>Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W. and Kendrick, B. 2011. *The Genera of Hyphomycetes*. The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 997p.
- <sup>35</sup>Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. Second Edi. California: Benjamin Cummings. 377p.
- <sup>36</sup>Magurran, A.E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Oxford: Blackwell publishing company. 215p.
- <sup>37</sup>Begon, M., Townsed, C.R. and Harper, J.L. 2006. *Ecology from Individuals to Ecosystems*. Fourth. Australia: Blackwell publishing. 714p.
- <sup>38</sup>Horbe, A.M.C. and Oliveira, L.G.S. 2008. Química de igarapés de água preta do nordeste do Amazonas - Brasil. *Acta Amazonica*. **38**(4):753-760.
- <sup>39</sup>Pinto, A.G.N., Silva, M.S.R., Pascoaloto, D. and Santos, H.M.C. 2009. Efeitos da contribuição antrópica sobre as águas do rio negro, na cidade de Manaus, estado do Amazonas. *Caminhos de Geografia*. **10**(29):26-32.
- <sup>40</sup>Aprile, F., Darwich, A.J., Siqueira, G.W. and Santos, F.R.R. 2013. Application of Hydrological and Limnological studies on Building Model for Water circulation of Meromictic Black Water Lakes at the Central. *International Research Journal of Environment Sciences*. **2**(7):58-63.
- <sup>41</sup>Park, D. 1972. On the ecology of heterotrophic micro-organisms in fresh-water. *Transactions of the British Mycological Society*. **58**(2):291-299.

## 7. CAPÍTULO 2

### **POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE *Longicollum biappendiculatum* COM BASE NO DNAr DAS REGIÕES *Its* E 28S DE INDIVÍDUOS ISOLADOS A PARTIR DE MADEIRA SUBMERSA DO PERU E BRASIL**

Cortez ACA<sup>1,2\*</sup>, Souza JVB<sup>1,2</sup>, Miller AN<sup>3</sup>, Shearer CA<sup>4</sup> and Zelski SE<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-97, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia – BIONORTE – Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>3</sup>Illinois Natural History Survey, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL 61820

<sup>4</sup>Department of Plant Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Room 265 Morrill Hall, 505 South Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801

#### **Resumo**

*Longicollum biappendiculatum* foi descrito como uma nova espécie, no entanto, o posicionamento filogenético desse táxon ainda não havia sido estabelecido. O objetivo deste estudo foi estabelecer o posicionamento filogenético de *Longicollum biappendiculatum* e realizar uma análise micromorfológica de novos indivíduos isolados na Amazônia Brasileira. Para tanto, quatro indivíduos isolados do Peru e um indivíduo isolado do Brasil tiveram o seu DNA extraído e amplificados os fragmentos dos genes 28S e *Its*, os fragmentos amplificados



foram sequenciados e avaliados frente a sequências presentes no GenBank. Em adição, quatro indivíduos obtidos no Brasil foram avaliados micromorfológicamente e comparados com as descrições prévias dos isolados do Peru. Os resultados obtidos posicionaram, filogeneticamente, *L. biappendiculatum* na família Annulatascaceae *stricto sensu*, sendo um táxon semelhante a *Submersisphaeria aquatica*. Os indivíduos obtidos no Brasil apresentam características micromorfológicas semelhantes aos encontrados no Peru.

**Palavras chave:** Annulatascaceae, ascomicetos, decomposição, água doce, sistemática

## INTRODUÇÃO

Ascomicetos de água doce são fungos presentes em ambientes lênticos e lóticos, onde desempenham um papel importante na decomposição dos resíduos vegetais submersos. Apesar da importância desse grupo, poucos estudos quanto a sua biodiversidade e distribuição foram realizados na América do Sul (Shearer et al. 2015).

Uma investigação, recente realizada no Peru, descreveu, pela primeira vez, a nova espécie *Longicollum biappendiculatum*. Essa espécie foi alocada na família Annulatascaceae baseada nas suas características micromorfológicas (Zelski et al. 2011). No entanto, estudos de posicionamento filogenéticos necessitavam ser realizados para confirmação desse posicionamento taxonômico. Também, recentemente, Cortez et al. (2016) investigando um ambiente lêntico na Amazônia Brasileira, identificaram quatro indivíduos compatíveis com esse novo táxon, aumentando o conhecimento quanto a sua distribuição geográfica.

Diante da necessidade de conhecer mais sobre essa nova espécie, o objetivo deste estudo foi estabelecer o posicionamento filogenético de *Longicollum biappendiculatum* e realizar uma análise micromorfológica de novos indivíduos isolados na Amazônia Brasileira.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**Microrganismos estudados:** No presente estudo, foram investigados um total de quatro indivíduos de *L. biappendiculatum* isolados no Peru por Zelski et al. (2011) e quatro indivíduos isolados no Brasil durante o trabalho realizado por Cortez et al. (2016).

### **Posicionamento Filogenético de *Longicollum biappendiculatum***

**Extração do DNA:** O micélio de quatro culturas puras do Peru e uma do Brasil, foi triturado em nitrogênio líquido em um almofariz e pilão. Em seguida, o DNA foi extraído com o DNeasy Planta Mini Kit (Qiagen Sciences Inc., Valencia CA) de acordo com as instruções do fabricante.

**PCR:** A PCR foi realizada utilizando o Kit Illustra Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare) e um termociclador MJ Research PTC-200. Os pares de iniciadores utilizados foram 28S (LROR, LR3) e *Its* (*Its1F*, *Its4*) (Rehner & Samuels 1994, Vilgalys & Hester 1990, Gardes & Bruns 1993, White et al. 1990). Foram utilizados os seguintes parâmetros de PCR: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 15 s, 72 °C durante 10 s com um passo final de extensão de 72 °C durante 10 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen Sciences Inc., Valencia CA) de acordo com as instruções do fabricante.

**Sequenciamento:** As reações de sequenciamentos foram realizadas usando os reagentes BigDye® Kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e os iniciadores acima mencionados. A reação de sequenciamento foi realizada em um DNA Analyzer AB 3730xl no W. M. Keck Centro de Comparativa e Funcionais Genômica da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign.

**Montagem das sequências:** As sequências foram montadas usando Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) para o alinhamento inicial. A continuação do alinhamento foi realizada usando o MUSCLE 3.6 (Edgar 2004) em SeaView 4 (Gouy et al. 2010).

**Sequências analisadas nesse estudo:** Membros de Annulatasceae com dados de sequência disponíveis no GenBank foram utilizados nas análises filogenéticas. As sequências recém geradas da seleção dos táxons de Annulatasceae também foram incluídos. Representantes adicionais das principais ordens de Sordariomycetes foram adicionados aos alinhamentos juntamente com os táxons de Annulatasceae. Uma lista completa dos táxons e a informação da sequência depositada pode ser encontrada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Números de acesso GenBank das sequências 28S e *Its* das sequências analisadas neste estudo. Os números em negrito representam sequências recém-geradas.

Táxon	28S	<i>Its</i>
<i>Annulatasceus aquatorba</i>	JN226107	N/A
<i>Annulatasceus biatriisporus</i>	AY316352	N/A
<i>Annulatasceus hongkongensis</i>	AF132319	N/A
<i>Annulatasceus nilensis</i>	HQ616536	N/A
<i>Annulatasceus triseptatus</i>	AY780049	<b>KU975069</b>
<i>Annulatasceus velatisporus</i>	AY312320	AF177150
<i>Annulatasceus velatisporus</i>	AF316355	N/A
<i>Annulusmagnus triseptatus</i>	AY316353	N/A

Táxon	28S	Its
<i>Annulismagnus triseptatus</i>	AY346257	N/A
<i>Apiognomonina errabunda</i>	AF408334	DQ313525
<i>Aquaticola hongkongensis</i>	AF132321	AF177156
<i>Aquaticola hyalomura</i>	AY590291	N/A
<i>Ascitendus austriacus</i>	AY590294	N/A
<i>Ascitendus austriacus</i>	AY590293	N/A
<i>Ascitendus austriacus</i>	AY590292	<b>KU975065</b>
<i>Ascitendus austriacus</i>	AY094186	<b>KU975066</b>
<i>Brunneispora aquatica</i>	N/A	AF177154
<i>Camarops lutea</i>	JN673032	N/A
<i>Cataractispora appendiculatum</i>	N/A	<b>KU975062</b>
<i>Cataractispora receptaculorum</i>	AF132327	AF177153
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	U17401	N/A
<i>Cercophora arenicola</i>	N/A	JN673037
<i>Chaetomium globosum</i>	N/A	KC109754
<i>Chaetosphaeria innumera</i>	AY017375	N/A
<i>Chaetosphaeria laterallis</i>	N/A	JN673039
<i>Claviceps purpurea</i>	AF543789	N/A
<i>Conlarium duplumascospora</i>	JN936991	N/A
<i>Cyanoannulus petersenii</i>	AY316359	<b>KU975064</b>
<i>Diaporthe eres</i>	AF408350	DQ491514
<i>Eutypa lata</i>	DQ836903	N/A
<i>Fluminicola coronata</i>	AF132332	AF177152
<i>Fragosphaeria purpurea</i>	AF096191	AB278192
<i>Fusoidispora aquatica</i>	AY780365	N/A
<i>Halosphaeria appendiculata</i>	U46885	N/A
<i>Hyalorostratum brunneisporum</i>	HM191720	N/A
<i>Hypocrea lutea</i>	AF543791	N/A
<i>Lasiosphaeria ovina</i>	N/A	JN673050
<i>Nectria cinnabarina</i>	U00748	N/A
<i>Neurospora crassa</i>	AF286411	N/A
<i>Nohea umiumi</i>	U46893	N/A
<i>Ophioceras tenuisporum</i>	AY346295	N/A
<i>Ophiostoma piliferum</i>	DQ470955	AF221070
<i>Ophiostoma stenoceras</i>	DQ836904	AF484475
<i>Paoayensis lignicola</i>	EF622535	N/A
<i>Papulosa amerospora</i>	DQ470950	N/A
<i>Pseudoproboscispora caudae-suis</i>	AY094191	<b>KU975070</b>
<i>Pseudoproboscispora caudae-suis</i>	AY094192	<b>KU975068</b>
<i>Rhamphoria delicatula</i>	AF261068	N/A
<i>Sordaria fimicola</i>	AY545728	N/A
<i>Stachybotrys chartarum</i>	AY489712	N/A
<i>Submersisphaeria aquatica</i>	AY094194	N/A
<i>Submersisphaeria aquatica</i>	AY094193	<b>KU975067</b>
<i>Teracosphaeria petroica</i>	EF063576	N/A
<i>Valsa ambiens</i>	AF362564	AY347330

Táxon	28S	Its
<i>Verticicola confusa</i>	AF132331	AF177151
<i>Xylomelasma sordida</i>	AY761087	N/A
<i>Xylaria acuta</i>	AY544676	N/A
<i>Xylaria hypoxylon</i>	AY544648	N/A

N/A = Não depositado no GenBank

28S = Subunidade larga ribossomal

Its = Espaço interno transcrito

**Análises filogenéticas:** Análises de máxima verossimilhança foram realizadas utilizando RAxML-HCP2 v.7.0.4 em XSEDE (Stamatakis 2006, Stamatakis et al. 2008) no CIPRES Portal v.2.0 (Miller et al. 2010). Sob as configurações padrão e modelos GTR com 1000 pesquisas de inicialização rápidas. A árvore mais provável da análise de risco foi inicialmente vista usando Dendroscope v.3 (Huson & Scornavacca 2012) e, em seguida, ilustrada no Adobe Illustrator CS2. Análises Bayesian foram realizadas usando MrBayes V.3.2.3 em XSEDE (Huelsenbeck et al. 2001, Ronquist & Huelsenbeck 2003) no CIPRES Portal v.2.0 (Miller et al. 2010) utilizando os parâmetros obtidos com jModelTest 2.1.4 (Posada 2008, Darriba et al. 2012) com duas pistas e quatro cadeias. Para as sequências 28S o modelo escolhido foi GTR+I+G (-lnL 6581,2407). As bases de frequências foram: f [A] = 0,2323, f [C] = 0,2372, f [G] = 0,3158, e f [T] = 0,2417. Categorias de táxons foram: [AC] = 0,6585, [AG] = 1,8258, [AT] = 0,6635, [CG] = 0,6006, [CT] = 6,758, e [GT] = 1,0000. O conjunto de dados teve sítios invariáveis 0,162 % e uma forma gama de 0,4860. Para as sequências Its, escolheu-se o modelo GTR+I+G (-lnL 9475,0608). As frequências de base foram: f [A] = 0,2435, f [C] = 0,2797, f [G] = 0,2326, e f [T] = 0,2442. Categorias de táxons foram: [AC] = 1,5069, [AG] = 1,5985, [AT] = 1,4149, [CG] = 0,9893, [CT] = 3,8118, e [GT] = 1,0000. O conjunto de dados teve sítios invariáveis 0,032% e uma forma gama de 0,4930. Um total de 10.000.000 gerações foram executados com árvores amostradas cada geração 1000,

resultando num total de 10.000 árvores. As primeiras 1.000 árvores foram descartadas. Todas as análises tinham alcançado estacionaridade nesse ponto, e os restantes 9.000 árvores foram utilizadas para estabelecer probabilidades posteriores (PP) com um critério regra da maioria de 50%.

**Análises micromorfológicas:** Imagens micromorfológicas de quatro indivíduos obtidos no Brasil durante trabalho de Cortez et al. (2016) foram avaliadas e comparadas com as apresentadas no estudo realizado por Zelski et al. (2011). Foi estudado especificamente as dimensões e morfologias de ascomas, parede do ascoma, pescoço, paráfise, base dos ascos, anel e ascósporos. Essa análise resultou em uma descrição detalhada dos indivíduos isolados de amostras no Brasil.

## **RESULTADOS**

**Sequências depositadas:** Neste estudo, fragmentos dos genes (28S e *Its*), de cinco indivíduos do novo táxon (*L. biappendiculatum*), quatro do Peru e um do Brasil, foram sequenciados para sua avaliação filogenética e tiveram as suas sequências depositadas no GenBank. Os números de depósito das sequências no GenBank, códigos e suas origens são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2-** Números de depósito das sequências no GenBank, código do isolados e origem dos isolados de *Longicollum biappendiculatum* avaliados no presente estudo.

Isolados	Gene 28S		Gene Its		Origem	Autor
	Número de acesso GenBank	Código do Isolado	Número de acesso GenBank	Código do Isolado		
<i>Longicollum biappendiculatum</i>	<b>KU975071</b>	ILL 40794	<b>KU975061</b>	ILL 40794	Peru (Zelski et al. 2011)	
	<b>KU975072</b>	PE0017-1b	N/A	N/A	Peru (Zelski et al. 2011)	
	<b>KU975073</b>	PE0017-2a	N/A	N/A	Peru (Zelski et al. 2011)	
	<b>KU975074</b>	PE0017-2b	N/A	N/A	Peru (Zelski et al. 2011)	
	<b>KU975075</b>	INPA A.C. 2-1a	<b>KU975063</b>	INPA A.C. 2-1a	Brasil (Cortez et al. 2016)	

N/A = Não depositado no GenBank

28S = Subunidade larga ribossomal

Its = Espaço interno transcrito

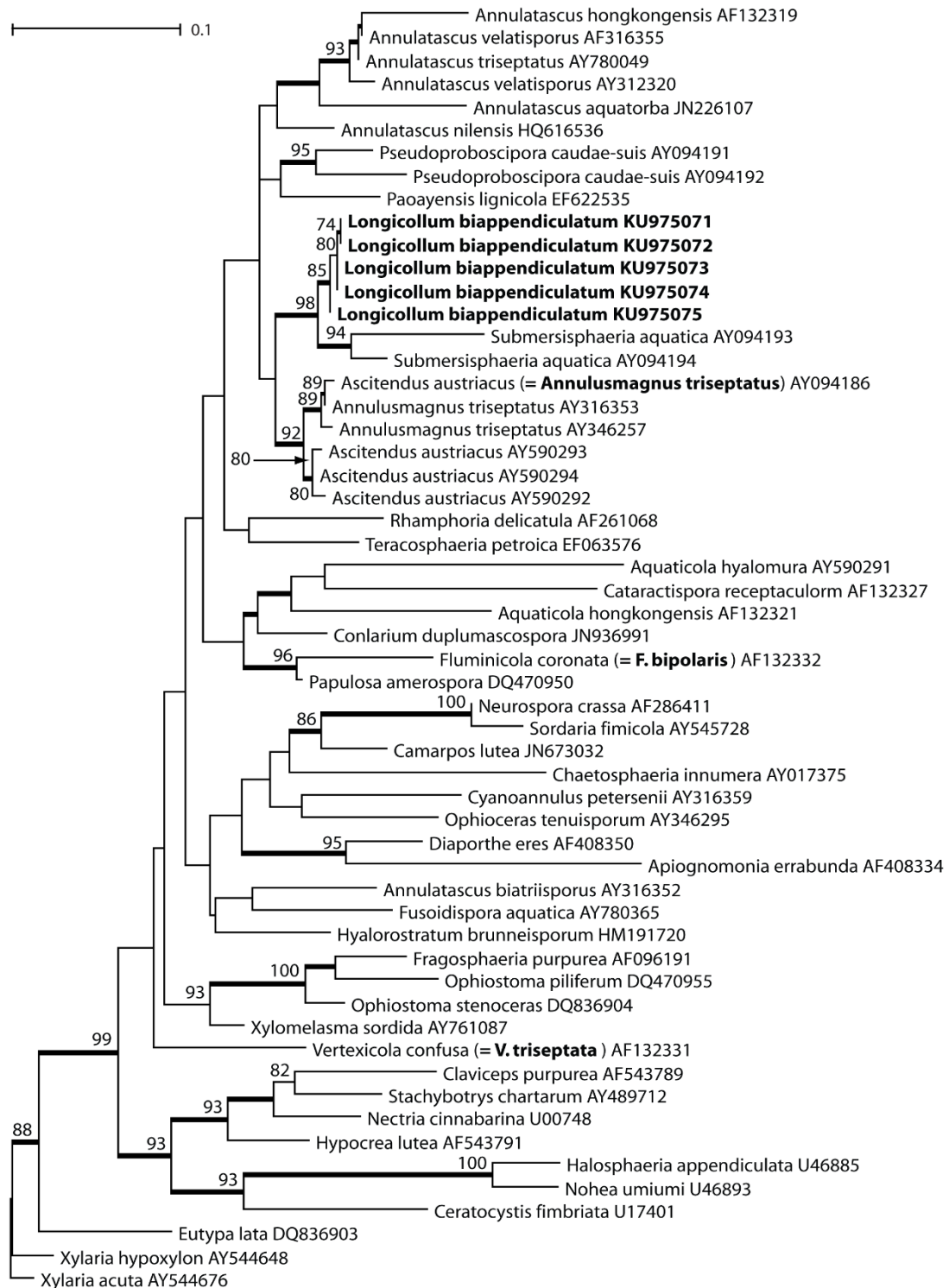
**Análise das sequências de DNA obtidas:** As sequências dos fragmentos dos genes 28S e Its, dos cinco indivíduos de *L. biappendiculatum*, indicaram alta similaridade entre esses, confirmando, como adequado, o agrupamento desses em um único táxon. A análise filogenética demonstrou ainda que, esse novo táxon apresenta-se próximo as espécies do gênero *Submersisphaeria*, bem como da família Annulatascaceae. Por sua vez, a família Annulatascaceae “sensu stricto” apresenta-se como um grupo monofilético (mais próximo) com a ordem Ophiostomatales.

**Morfologia:** O táxon *Longicollum biappendiculatum* foi pela primeira vez descrita no trabalho: *Longicollum biappendiculatum* Zelski, Raja, A.N. Mill & Shearer. *Mycosphere* 2 (5): 540, 2011. MB 560934

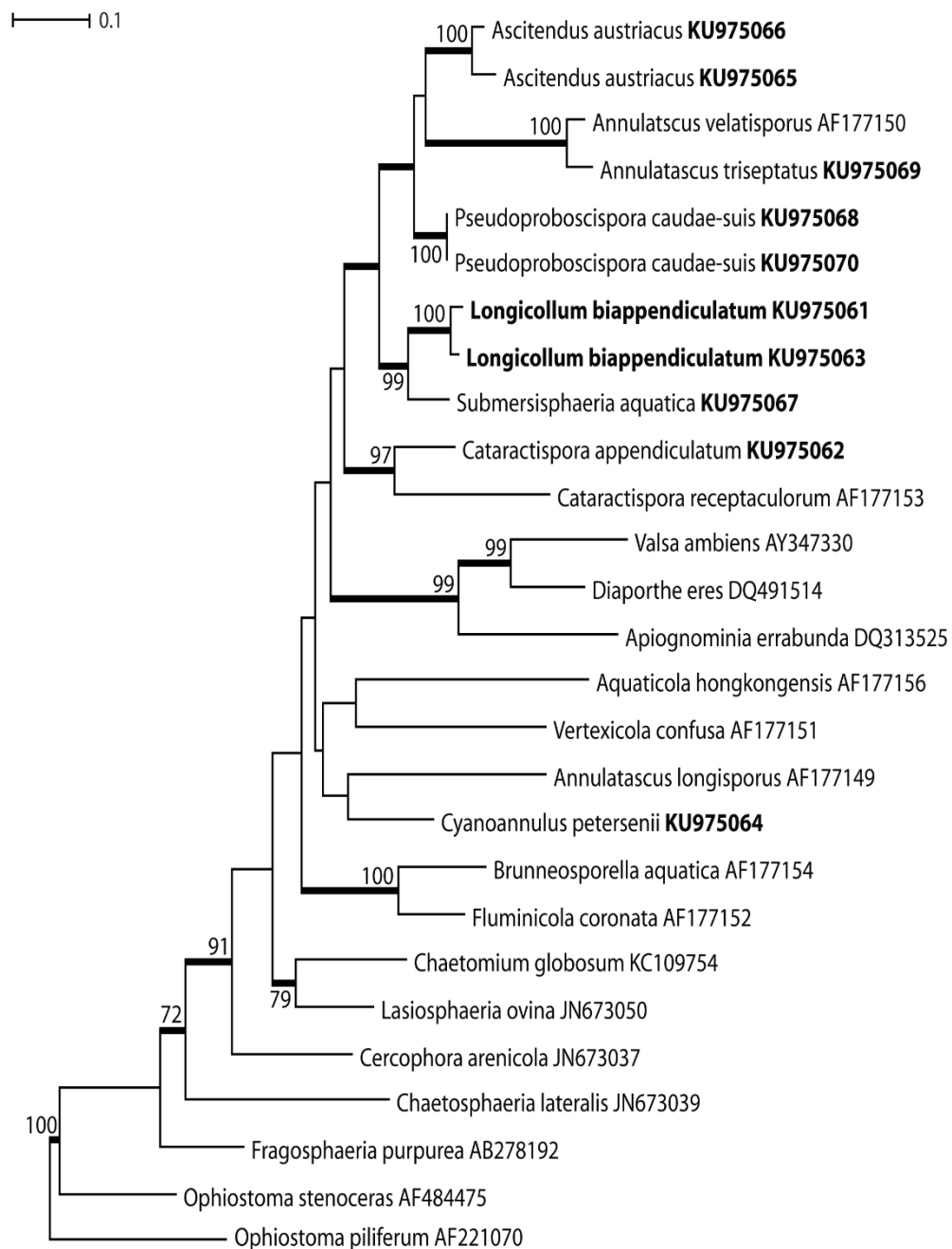
Com a finalidade de descrever a morfologia dos 4 indivíduos observados no Brasil, esses foram estudados quanto a suas características micromorfológicas. Os indivíduos previamente observados no Peru (Zelski et al. 2011) foram utilizados como holotype. O resultado demonstrou que a descrição morfológica prévia (holotype) e a dos indivíduos observados no Brasil é semelhante. Uma descrição detalhada micromorfologia é apresentada a seguir:

**Descrição dos indivíduos isolados na Amazônia Brasileira: Ascomas** marrom claro, disperso, ventre imerso, com pescoço saliente a partir da superfície perpendicular à superfície (Figura 3A), dispersos, ventre com 290-320  $\mu\text{m}$  de largura x 340-370  $\mu\text{m}$  altura ( $\bar{x} = 300 \times 345 \mu\text{m}$ , n = 10), subglobosos. **Parede do ascoma** marrom, membranosos, composto por 4-6 camadas de células pseudo-parenquimatosas, marrom, sub-hialino e lateralmente comprimido internamente, com 15-20  $\mu\text{m}$  de espessura. **Pescoço** marrom e hialino, hialina no vértice, cilíndrico, 415-480  $\mu\text{m}$  longo  $\times$  80-120  $\mu\text{m}$  de largura, constituído por células-hifas entrelaçadas, com paredes celulares externos marrons abaixo do ápice, periférica (Figuras 3B-D). **Paráfise** hialina, 5-9  $\mu\text{m}$  de largura na base, afinando para 2-3  $\mu\text{m}$  na direção do vértice, 110-185  $\mu\text{m}$  de comprimento, septado (Figura 3F). **Ascós** unitunicados, cilíndrico, 8 esporos, 160-187  $\mu\text{m}$  longo  $\times$  14-18  $\mu\text{m}$  de largura ( $\bar{x} = 169 \times 15.5 \mu\text{m}$ , l:w = 10.9, n = 10) (Figura 3E). **Base dos ascós** com pedicelo afinando, 15  $\mu\text{m}$  de *sporifera pars*. **Anel J-**, bipartido, 2-3  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  5-7  $\mu\text{m}$  de largura ( $\bar{x} = 2.7 \times 6 \mu\text{m}$ , l/w = .45, n = 10) (Figuras 3G-H). **Ascósporos** hialinos, amplamente elipsoidal, asseptados, uniseriados sobrepostos, 16-23  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  11-15  $\mu\text{m}$  de largura ( $\bar{x} = 20 \times 13 \mu\text{m}$ , l/w = 1.5, n = 30), multiguticulado, sem apêndices ou bainha (Figuras. 3I-K).





**Figura 1.** Filograma da árvore mais provável a partir da análise do fragmento do gene 28S nrRNA obtida com RAxML (-lnL = 6581,2407). Números atribuídos a filiais indicam valores de suporte de inicialização ML  $\geq 70$  % e valores de suporte de probabilidade  $\geq 95$  % são indicados por ramos engrossados. Táxons em negrito representam os isolados com genes 28S recém-sequenciados.



**Figura 2.** Filograma da árvore mais provável da análise do fragmento do gene *Its* nrDNA obtida com RAxML ( $-\ln L = 9475,0608$ ). Números atribuídos a filiais indicam valores de inicialização  $ML \geq 70\%$  e valores de probabilidade posteriores  $\geq 95\%$  são indicados por ramos engrossados. Táxons em negrito representam os isolados com genes *Its* recém-sequenciados e com as identidades das sequências de táxons corrigidos e depositadas no GenBank.



**Figura 3.** Micromorfologias obtidas de indivíduos pertencentes ao novo táxon *Longicollum biappendiculatum* obtidos de fragmentos de madeira em decomposição, em ambientes aquáticos do Brasil (Cortez et al. 2016). A. Pescoço saliente de substrato. B. Pescoço montado na água. C. Pescoço ilustrando ponta hialina. D. Pescoço ilustrando superfície e paráfises. E. Ascus. F. paráfises. G, H. Ápice dos ascus. I-K. Ascósporos.

Escala de Bars: A, B = 100  $\mu\text{m}$ ; C = 200  $\mu\text{m}$ ; D-G, I-K = 20  $\mu\text{m}$ ; H = 10  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

A família Annulatasceae foi criada para incluir as espécies sapróbicas de fungos filamentosos de água doce com as seguintes características: peritécio preto a marrom escuro, paráfises hialinas longa afinando, asco cilíndrico longo unitunicado e oito esporos com anéis proeminentes não amilóides apicais, hialina ou ascósporos marrons que podem ou não ter bainhas ou apêndices que são a formação variável de septos (Wong et al. 1998).

Zelski et al. (2011) descreveram o gênero *Longicollum* para acomodar *L. biappendiculatum*, inicialmente encontrado no Peru, este táxon foi encontrado, posteriormente, no Brasil, Costa Rica e Estados Unidos da América. *L. biappendiculatum* foi alocado na Família Annulatasceae com base em suas características morfológicas que incluem: ascomas marrom escuro, pescoço perfisado, longas paráfises hialinas septadas afinando, ascos cilíndricos unitunicados com anéis apicais, ascus J- e ascósporos com apêndices gelatinosos. O presente estudo é importante pois corrobora com a análise micromorfológica demonstrando filogeneticamente que *L. biappendiculatum* faz parte da família Annulatasceae *stricto sensu*, sendo um táxon semelhante a *Submersisphaeria aquatica*.

As características que distinguem, o gênero *Longicollum* dos demais gêneros de Annulatasceae *stricto sensu* são a presença de um pescoço longo hialino com células marrons intercaladas, ascomas marrom claro e uma combinação de ascósporos asseptados, multiguticulado, hialino, elipsoidais com ou sem apêndices apicais bipolares simples. *Longicollum* possui muitas características semelhantes ao gênero *Submersisphaeria aquatica* (Hyde, 1996). O ascoma de *Longicollum* é semelhante ao de *S. aquatica*, por ser imerso, possuir pescoço bem desenvolvido e ventre subgloboso composto por células pseudo-parenquimatosas. A diferença entre eles ocorre pelo fato do perídio de *L. biappendiculatum*

ser mais fino (15-20  $\mu\text{m}$  vs. 31-43  $\mu\text{m}$ ), e o pescoço é predominantemente hialino em contraste ao preto de *S. aquatica*. O asco em *Longicollum* é mais largo (14-18  $\mu\text{m}$ ) do que os de *S. aquatica* (11-12,5  $\mu\text{m}$ ). Os ascósporos de *Longicollum* são elipsoidais e multiguticulado, enquanto que os de *S. aquatica* vão de elipsoidais a fusiforme e contêm material granular. A diferença mais relevante entre os dois táxons é o fato dos ascósporos de *S. aquatica* serem predominantemente dematiáceos, com um septo, ausência de apêndices apicais e possuem poros germinativos hialinos, enquanto os ascósporos de *Longicollum* são asseptados, não possuem poros germinativos e são hialinos. Todas as outras espécies de *Submersisphaeria* possuem ascósporos marrons (Hyde 1996, Fröhlich & Hyde 2000, Zhou & Hyde 2000, Pinnoi et al. 2004, Wang et al., 2004).

Morfologicamente, os indivíduos de *L. biappendiculatum* coletados no Brasil, apresentaram poucas diferenças dos indivíduos coletados no Peru. Os ascomas dos indivíduos brasileiros eram maiores que o dos espécimes peruanos (340-370  $\mu\text{m}$  altura  $\times$  290-320  $\mu\text{m}$  de largura vs. 205-220  $\mu\text{m}$  altura  $\times$  155-160  $\mu\text{m}$  de largura) e com pescoços maiores (415-480  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  80-120  $\mu\text{m}$  de largura vs. 315-370  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  74-82  $\mu\text{m}$  de largura). Os ascos dos espécimes brasileiros são menores do que os holótipos de *L. biappendiculatum* (160-185  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  14-18  $\mu\text{m}$  de largura vs. 180-225  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  15-17  $\mu\text{m}$  de largura) e os anéis apicais dos ascos são mais curtos e mais largos (2-3  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  5-7  $\mu\text{m}$  de largura vs. 2-4  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  3-5  $\mu\text{m}$  de largura). Por fim, os ascósporos dos indivíduos brasileiros são menores do que os holótipos peruanos de *L. biappendiculatum* (16-23  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  11-15  $\mu\text{m}$  de largura vs. 26-35  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  12-14  $\mu\text{m}$  de largura) e ao contrário do holótipo, foram observadas a ausência de apêndices na amostra do Brasil. Acreditamos que essas diferenças morfológicas, juntamente com dados moleculares, caracterizam estas amostras como sendo a mesma espécie, ampliando a sua distribuição geográfica.

O presente trabalho foi importante por demonstrar que *L. biappendiculatum*, filogeneticamente apresenta-se como uma espécie fazendo parte da família Annulatascaceae *stricto sensu*, sendo um táxon semelhante a *Submersisphaeria aquatica*. Em adição, esse estudo amplia para a Amazônia Brasileira a distribuição desse táxon.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer Roberto Moreira pela ajuda na coleta de amostras. Além disso, muitos cidadãos do Estado do Amazonas permitem acesso aos rios através de sua propriedade privada e estão devidamente reconhecidos. Os autores também agradecem ao INPA e ao CNPq pelo apoio financeiro. O apoio financeiro da concessão Lemann para fomentar a colaboração com cientistas brasileiros, bem como materiais de laboratório é muito apreciada. Finalmente, o apoio financeiro da NSF concede DEB 08-44722 e DEB-1214369 foi inestimável para esta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- Cortez, A. C. A., Sanches, M. A., Zelski, S. E., & Souza, J. V. B. 2016. A comparison of the freshwater fungal community during the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 14 (2): 156-161.
- Darriba, D., Taboada G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-97.
- Fröhlich, J., and Hyde, K.D. 2000. Palm Microfungi. *Fungal Diversity Research Series* 3:1-393. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2):113-8.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- Huelsenbeck, J.P., Mark, P.V.D., and Ronquist, F.R. 2001. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. 3.1.2 <http://www.mrbayes.csit.fsu.edu/>.
- Huson, D.H. and Scornavacca, C. 2012. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology* 61(6): 1061-1067.
- Hyde, K.D. 1996. Tropical Australian freshwater fungi. X. *Submersisphaeria aquatica* gen. et sp. nov. *Nova Hedwigia* 62: 171-175.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Paper presented at Proceedings of the Gateway Computing Environments workshop (GCE), 14 Nov. 2010.
- Pinnoi, A., Pinruan, U., Hyde, K.D., and Lumyong, S. 2004. *Submersisphaeria palmae* sp. nov. with a key to species and notes on *Helicoubisia*. *Sydowia* 56(1):72-78.
- Posada, D. 2008. jModeltest - phylogenetic model averaging. *Molecular Biological Evolution* 25:1253-1256.
- Rehner, S.A. and Samuels, G.J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed from nuclear large subunit DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625- 634.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3.1.2: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

- Shearer, C.A, Zelski, S.E, Raja, H.A., Miller, A.N., and Janovec, J.P. 2015. Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. *Biodiversity and Conservation* 24: 1877–1897.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics* 22(21): 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., and Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57: 758–771.
- Vilgalys, R. and Hester, M, 1990. Rapid identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Wang, Y.Z., Aptroot, A., and Hyde, K.D. 2004. Revision of the genus *Amphisphaeria*. *Fungal Diversity Press*, pp. 62-64.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In N. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). New York: Academic Press.
- Wong, S.W., Hyde, K.D., and Jones, E.B.G. 1998 - Annulatasceae, a new ascomycete family from the tropics. *Systema Ascomycetum* 16: 17-25.
- Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N., Barbosa, F.R., Shearer, C.A. 2011. *Longicollum biappendiculatum* gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycetes from the Neotropics. *Mycosphere* 2:539–545.
- Zhou, D.Q. and Hyde, K.D. 2000. *Submersisphaeria bambusicola* sp. nov. from bamboo in Hong Kong. *Fungal Diversity* 4:181-186.



## 8. CAPÍTULO 3

### **AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE ISCAS DE MADEIRA PARA INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS PRESENTES EM MADEIRA SUBMERSA E EM DECOMPOSIÇÃO NO IGARAPÉ TARUMÃ AÇU, MANAUS, AMAZONAS, BRASIL**

Cortez ACA<sup>1,2</sup>, Zelski SE<sup>2,3</sup>, Souza JVB<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-97, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia – BIONORTE – Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>3</sup>Illinois Natural History Survey, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL

<sup>4</sup>Department of Plant Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Room 265 Morrill Hall, 505 South Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801

#### **RESUMO:**

Ascomycetos de água doce são importantes decompositores de madeiras e detritos herbáceos em ecossistemas aquáticos. Apesar da importância ecológica desse grupo, poucos estudos, quanto a sua diversidade, foram realizados na Amazônia Brasileira. O presente trabalho teve como objetivo descrever a diversidade de fungos presentes em amostras de madeira de um ambiente lótico na Amazônia e avaliar se a metodologia “iscas de madeira” era adequada como metodologia utilizada para amostragem. O local de coleta foi o Igarapé Tarumã Açú, perto de Manaus, Amazonas, Brasil. Na amostragem convencional, foram

coletados 30 fragmentos de madeira naturalmente em decomposição. Para a amostragem do tipo “isca de madeira”, 30 fragmentos de madeira foram confeccionados, previamente esterilizados, submersos no local de estudo e sofreram decomposição por seis meses. Os fragmentos coletados foram investigados quanto a presença de fungos e os indivíduos que surgiram foram sistematizados em táxons. A diversidade resultante das duas diferentes formas de coletas (convencional e pela metodologia de “iscas de madeira”) puderam ser comparadas pelo índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') e pelo índice de similaridade de Sorensen (S'). Quanto aos resultados de diversidade, observou-se que, nas amostras de madeira (naturalmente em decomposição) foram observados 96 indivíduos pertencentes a 36 táxons (20 ascomicetos meiospóricos e 16 mitospóricos). Os táxons de maior abundância relativa foram *Spinulospora pucciniophila*, *Cancellidium* sp., *Brachydesmiella* sp., *Chloridium* sp., *Longicollum biappendiculatum* e *Torrentispora* sp. 01. Quanto a avaliação da metodologia de “iscas de madeira”, observou-se que, as amostras naturalmente em decomposição apresentaram um índice de diversidade de 3,3555, enquanto que, as amostras tipo “iscas de madeira” apresentaram diversidade de 2,8163. Observou-se também que, o índice de similaridade entre os fungos das diferentes coletas foi somente 0,2222. Portanto, o presente estudo demonstrou alta diversidade fúngica nas madeiras do local de estudo e que o método de “iscas de madeira”, nas condições experimentais, não foi adequado para descrever essa diversidade.

**Palavras Chave:** Amazônia, Diversidade, Ascomicetos de água doce, Madeira, Iscas de madeira.

## INTRODUÇÃO

Os fungos de água doce são importantes decompositores de madeira e de detritos nos ecossistemas aquáticos, no entanto, conhece-se pouco sobre a sua diversidade. Dessa forma, existem verdadeiras lacunas de conhecimento a respeito da diversidade desses organismos em diversas regiões do mundo, incluindo a Amazônia Brasileira. Nessa última, alguns poucos estudos foram realizados, dois desses (Monteiro et al. 2014; Monteiro & Gusmao 2014) limitaram-se a estudar os fungos associados a decomposição de folhas e um desses (Cortez et al. 2016) estudou os fungos associados a madeira em decomposição de um ambiente lântico.

Ainda sobre os estudos de avaliação de diversidade, uma estratégia que tem sido utilizada para estudar fungos de água doce é a metodologia de “iscas de madeira” (Sivichai et al. 2000). Quanto a essa metodologia, fragmentos de madeira são esterilizados e, em seguida, dispostos para serem decompostos no ambiente aquático no qual se deseja estudar a diversidade. Ao fim de um período, as iscas de madeira são recolhidas e a diversidade fúngica, presente nesses é descrita. No entanto, poucos estudos foram realizados avaliando-se se essa metodologia é adequada para descrever a diversidade.

Nesse sentido, faz-se necessários estudos que descrevam a diversidade de fungos decompositores de madeira em ambientes lóticos na Amazônia, bem como, faz-se necessário avaliar se a metodologia de “iscas de madeira” é útil em descrever a biodiversidade naturalmente existente nos ambientes aquáticos. Portanto, com a intenção de preencher esta lacuna no conhecimento da região Amazônica, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos de um ambiente lótico da região Amazônica (igarapé Tarumã Açu perto de Manaus, Amazonas, Brasil) e avaliar a metodologia de “iscas de madeira”.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Área de estudo*

Igarapé Tarumã Açu, posição 2 ° 79'14 "S e 60 ° 08'59" W, zona rural da cidade de Manaus. A água do igarapé apresentava cor escura, baixa turbidez e pH ácido (Pinto et al. 2009). A média anual da temperatura e índice pluviométrico do local de coleta foram 25 °C e 2.300 mm, respectivamente. Esse igarapé apresentava uma mata ciliar composta principalmente de plantas nas famílias Fabaceae, Sapotaceae e Lecythydaceae que predominam na região (Oliveira & Amaral 2005; Oliveira et al. 2008).

### *Coleta de amostras*

A coleta das amostras compostas de fragmentos de madeira submersa em decomposição foi feita de forma convencional e também utilizando a metodologia de iscas de madeira descrita por Sivichai et al. (2000).

Na coleta convencional, 30 fragmentos de madeira de ocorrência natural (7- 23 cm de comprimento e 4-15 cm de diâmetro) foram coletados aleatoriamente no igarapé.

No caso da metodologia de iscas de madeira, inicialmente, foi obtida madeira da espécie vegetal Castanha-Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess), da família Lecythydaceae, recentemente cortada. Esta espécie ocorre em toda a região Amazônica, inclusive próximo ao local da coleta (Loureiro et al. 2000). Com a madeira desse espécime, foram produzidos 30 fragmentos com as seguintes dimensões: 15×2.5×3 cm. Esses fragmentos foram esterilizados (autoclavação por três vezes consecutivas a 121 °C durante 15 min) e em cada bloco foram perfurados dois orifícios (1 mm de diâmetro) onde foram passadas cordas de nylon de forma a

obter um formado de escada com separação de 2 cm entre as madeiras. Essas iscas de madeiras foram amarradas ao tronco de uma árvore e a garrafas cheias de areia, com a finalidade de manter as iscas de madeira submersas a uma profundidade de ~ 1 m. As iscas de madeira ficaram em decomposição por 6 meses (Maio-Outubro 2015).

As amostras de madeira, naturalmente em decomposição, e as iscas de madeira foram recolhidas e analisadas simultaneamente. Todas as amostras foram colocadas em sacos plástico com toalhas de papel úmidos selados e transportados para o Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, onde foram lavadas com água corrente, colocados em câmaras úmidas (caixas de plástico revestidas com papel toalha úmida) e incubadas à temperatura ambiente.

### ***Diversidade de fungos***

Semanalmente, ao longo de seis meses, as amostras de madeira foram examinadas quanto a presença de estruturas reprodutivas de fungos usando um estereomicroscópio Stemi DV4 (Zeiss, Alemanha). As estruturas reprodutivas visualizadas foram transferidas, com o auxílio de agulhas, para lâminas de microscopia que continham água destilada, usando o microscópio AxiosKop 40 (Zeiss, Germany) (Shearer et al. 2004). A identificação dos táxons foi efetuada com base na morfologia (Cai et al. 2006). Fungos mitospóricos foram identificados com base no tipo de conidiogêneses, morfologia dos conidióforos e dos conídios (Seifert et al. 2011). Lâminas permanentes foram preparadas utilizando a técnica de Volkmann-Kohlmeyer e Kohlmeyer (1996).

### *Análise de dados*

No presente estudo, o conceito de indivíduo foi “unidade de vida que se manifesta em um certo local”. O conceito de táxon foi o agrupamento de indivíduos morfologicamente ou filogeneticamente similares e o conceito de táxons foi o de o plural de táxon. A frequência, a riqueza (números de táxons), diversidade biológica e a semelhança das comunidades foram calculadas para cada metodologia.

Para caracterizar a diversidade da comunidade de fungos foi utilizado o índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) (Krebs 1989). Quanto mais alto esse índice maior heterogeneidade e diversidade. A fórmula abaixo foi usada para realizar estes cálculos:

$$H' = -\sum (p_i) * (\ln.p_i)$$

Onde  $p_{in} = \frac{n_i}{N}$

$n_i$  = é o número individual da  $i$ -ésima táxons.

$N$  = o número individual de todos os táxons.

O índice de equitabilidade ( $E$ ) também foi calculado (Magurran 2004). Este índice representa a uniformidade do número de indivíduos por táxon. A equitabilidade tende para 0 quando um táxon domina a comunidade, e se aproxima de 1, quando todos os táxons têm a mesma abundância. O índice é expresso pela seguinte fórmula:

$$E = H' / \ln S$$

Onde:

$H'$  = Índice de Shannon-Weaver baseado em número de indivíduos

$S$  = Número de espécies presentes na amostra.

Para avaliar as diferenças entre as comunidades de fungos na madeira naturalmente em decomposição e a metodologia de iscas de madeira, foi calculado o índice de similaridade Sorensen ( $S'$ ), com valores que variam de 0 (nenhuma semelhança) a um (similaridade absoluta). Este índice foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$S' = \frac{2c}{a + b}$$

Onde:

a = é o número total de táxons coletados na condição A

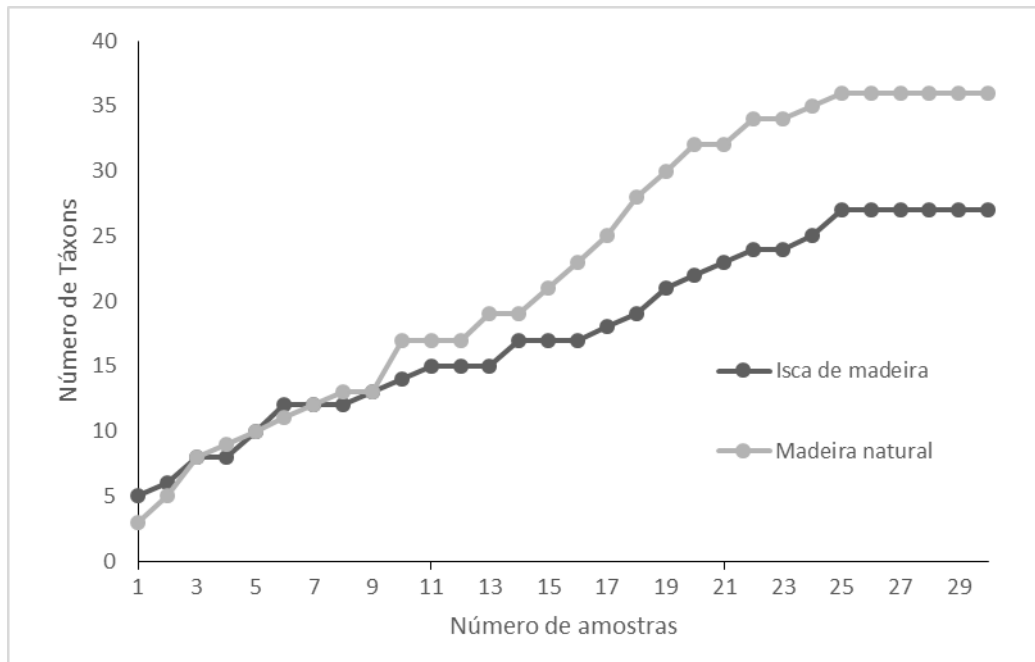
b = b é o número total de táxons coletados na condição B

c = número de táxons comum em ambas as condições.

As curvas da espécie-área foram plotados para as duas metodologia a fim de avaliar o esforço de amostragem (Begon et al. 2006).

## **RESULTADOS**

Com a finalidade de investigar se, o esforço amostral foi suficiente para explicar a diversidade no número de amostras investigadas, uma curva de acumulação foi elaborada relacionando o número de novos táxons com o número de amostras coletadas (Figura 1). Como pode ser observado, não foram observados novos táxons após a investigação da diversidade de 25 amostras de madeira não importando o tipo de amostragem.



**Figura 1.** Curva de acumulação do número de táxons de fungos em relação ao esforço amostral de madeira naturalmente em decomposição e de iscas de madeira (decompondo submersas por 6 meses), no igarapé do Tarumã Açu, Manaus, AM.

Nas “iscas de madeira” foram observados 217 indivíduos pertencentes a 27 táxons (9 Ascomycetos meiospóricos e 18 mitospóricos) (Tabela 1). Nas amostras de madeira, naturalmente em decomposição, foram observados 96 indivíduos pertencentes a 36 táxons (20 Ascomycetos meiospóricos e 16 mitospóricos) (Tabela 2).

Os indivíduos isolados das iscas de madeira puderam ser sistematizados em um táxon em nível de espécie, 21 táxons em nível de gênero, 1 táxon em nível de ordem e 1 táxon em nível de classe. Enquanto que, os indivíduos das amostras naturalmente em decomposição puderam ser sistematizados em 10 táxons em nível de espécies, 16 táxons em nível de gênero, 1 táxon em nível de ordem e os 2 táxons em nível de classe. A dificuldade em classificar todos os indivíduos em nível de espécies reflete a existência de novas espécies ainda não descritas na literatura.



**Tabela 1.** Número e abundância relativa (%) dos táxons de fungos, presentes em amostras de madeira do tipo isca submersas por 6 meses no igarapé "Tarumã-Açu" (Manaus-Amazonas-Brasil).

<b>Táxons</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
<i>Dothideomycetes</i> sp. AMBME01	26	12
<i>Cryptophiale</i> sp. Piroz.	23	10,7
<i>Chloridium</i> sp. Link	23	10,7
<i>Cancellidium</i> sp. Tubaki	20	9,2
<i>Trichoderma</i> sp. Pers.	19	8,7
<i>Penicillium</i> sp. Link	18	8,2
<i>Cryptophialoidea</i> sp. Kuthub. & Nawawi	13	6,0
<i>Kionochaeta</i> sp. P.M. Kirk & B. Sutton	13	6,0
<i>Dactylaria</i> sp. Saac.	9	4,1
<i>Annulatascus tropicalis</i> Ranghoo & K.D. Hyde	9	4,1
<i>Xylomyces</i> sp. Goos, R.D. Brooks & Lamore	8	3,6
<i>Chaetosphaeria</i> sp. Tul. & C. Tul.	7	3,2
Meiospórico Não Identificado AMBME05	4	1,8
Meiospórico Não Identificado AMBME03	3	1,3
<i>Lasiosphaeria</i> sp. 1 Cesari & Notaris.	3	1,3
<i>Monodictys</i> sp. S. Hughes	3	1,3
<i>Lasiosphaeria</i> sp. 2 Cesati & Notaris.	3	1,3
<i>Helicosporium</i> sp. Nees	2	1,0
Pleosporales	2	1,0
<i>Thozetella</i> sp. Kuntze	2	1,0
<i>Brachydesmiella</i> sp. Arnaud & Hughe	1	0,5
<i>Dictyochaeta</i> sp. Speg.	1	0,5
<i>Minimidochium</i> sp. B. Sutton	1	0,5
Meiospórico Não Identificado AMBME04	1	0,5
<i>Nawawia</i> sp. Marvanová	1	0,5
<i>Sporoschisma</i> sp. Berk. and Br.	1	0,5
<i>Selenodriella</i> sp. R.F. Castañeda & W.B. Kendr.	1	0,5
<b>Total</b>	<b>217</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Número e abundância relativa (%) dos táxons de fungos, presentes em amostras de madeira naturalmente em decomposição no igarapé "Tarumã-Açu" (Manaus-Amazonas-Brasil).

<b>Táxons</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
<i>Spinulospora pucciniophila</i> Deighton	11	11,4
<i>Cancellidium</i> sp. Tubaki	7	7,2
<i>Brachydesmiella</i> sp. Arnaud & Hughe	5	5,1
<i>Chloridium</i> sp. Link	5	5,1
<i>Longicollum biappendiculatum</i> Zelski, F.R. Barbosa, Raja, A.N. Mill & Shearer	5	5,1
<i>Torrentispora</i> sp. 01 K.D. Hyde, Wai H. Ho, E.B.G. Jones, K.M. Tsui & S.W. Wong	5	5,1
<i>Intercalarispora nigra</i> J.L. Crane & Schokn.	4	4,1
<i>Dactylaria</i> sp. 01 Saac.	3	3,1
<i>Lophiostoma</i> sp. Ces. & De Not.	3	3,1
Dothideomycetes sp. AMMME01	3	3,1
Dothideomycetes sp. AMMME02	3	3,1
Meiospórico Não Identificado AMMME08	3	3,1
Meiospórico Não Identificado AMMME09	3	3,1
Meiospórico Não Identificado AMMME19	3	3,1
<i>Aquaticola</i> sp. Ho, K.M. Tsui, Hodgkiss & K.D. Hyde	2	2,2
<i>Annulatascus joannae</i> K.M. Tsui, I.J. Hodgkiss & K.D. Hyde	2	2,2
<i>Codinaea</i> sp. Maire	2	2,2
<i>Gonitrichum</i> sp. Nees & F.T. Nees	2	2,2
<i>Lasiosphaeria</i> sp. 01 Cesati & Notaris.	2	2,2
Meiospórico Não Identificado AMMME14	2	2,2
Meiospórico Não Identificado AMMME15	2	2,2
<i>Dactylaria</i> sp. 02 Saac.	2	2,2
Pleosporales	2	2,2
<i>Potamomyces armatisporus</i> K.D. Hyde	2	2,2
<i>Torrentispora</i> sp. 02 K.D. Hyde, Wai H. Ho, E.B.G. Jones, K.M. Tsui & S.W. Wong	2	2,2
<i>Annulatascus aquatorba</i> Boonyuen & Sri-indrasutdhi	1	1,0
<i>Annulatascus velatisporus</i> K.D. Hyde	1	1,0
<i>Camposporium</i> sp. Harkness	1	1,0
<i>Comesporasca caryotae</i> Sivan.	1	1,0
Meiospórico Não Identificado AMMME17	1	1,0
Mitospórico Não Identificado AMMMI01	1	1,0
<i>Natipusilla</i> sp. Ferrer, A.N. Mill. & Shearer	1	1,0
<i>Phaeosclera dematioides</i> Sigler, Tsuneda & J.W. Carmich.	1	1,0
<i>Pseudobotrytis terrestris</i> (Timonin) Subram.	1	1,0
<i>Sporoschisma</i> sp. Berk. & Br.	1	1,0
<i>Xylomyces</i> sp. Goos, R.D. Brooks & Lamore	1	1,0
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100</b>

Nas condições experimentais, os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') e equitabilidade (E) das amostras de “iscas de madeira” foram de 2,8167 e 0,619318, respectivamente. Os oito táxons mais frequentes foram: *Dothideomycetes* AMBME01, *Cryptophiale* sp. Piroz., *Chloridium* sp. Link, *Cancellidium* sp. Tubaki, *Trichoderma* sp. Pers., *Penicillium* sp. Link, *Cryptophialoidea* sp. Kuthub. & Nawawi e *Kionochaeta* sp. P.M. Kirk & B. Sutton.

Na “madeira naturalmente em decomposição”, os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') e equitabilidade (E) foram de 3,3555 e 0,796109, respectivamente. Os seis táxons mais frequentes foram: *Spinulospora pucciniophila* Deighton; *Cancellidium* sp. Tubaki; *Brachydesmiella* sp. Arnaud & Hughe; *Chloridium* sp. Link, *Longicollum biappendiculatum* Zelski, F.R. Barbosa, Raja, A.N., Mill & Shearer e *Torrentispora* sp. 01 K.D. Hyde, Wai H. Ho, E.B.G. Jones, K.M. Tsui & S.W. Wong. Esse resultado de prevalência fúngica é importante, pois é o primeiro realizado em ambiente lótico na Amazônia (Tabela 3).

Somente sete táxons foram encontrados simultaneamente nas amostras de “iscas de madeira” e de “madeira naturalmente em decomposição”. Destaca-se que, os táxons *Chloridium* sp. e *Cancellidium applanatum* Tubaki, foram encontrados simultaneamente e com alta abundância relativa em ambos os tipos de amostragens. O índice de similaridade Sorensen, avaliando ambas amostragens, foi baixo (0,2222) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Comparação da diversidade de fungos presentes em amostras de madeira naturalmente em decomposição e de madeira do tipo isca submersas no igarapé "Tarumã-Açu" (Manaus-Amazonas-Brasil).

Metodologias	Isca de madeira	Madeira natural
<b>Tamanho da amostra</b>	30	30
<b>Número de Ascomicetos (meiospórico)</b>	58	48
<b>Número de Ascomicetos (mitospórico)</b>	159	48
<b>Número médio de táxons por amostra</b>	7,23	3,2
<b>Táxons únicos</b>	07	11
<b>Sobreposição de táxons</b>		07
<b>Táxons mais comuns</b>	Dothideomycetes sp. AMBME01 (12,0%) <i>Cryptophiale</i> sp. (10,7%) <i>Chloridium</i> sp. (10,7%)  <i>Cancellidium</i> sp. (9,2%) <i>Trichoderma</i> sp. (8,7%)  <i>Penicillium</i> sp. (8,2%)  <i>Cryptophialoidea</i> sp. (6,0%) <i>Kionochaeta</i> sp. (6,0%)	<i>Spinulospora pucciniophila</i> (11,4%) <i>Cancellidium</i> sp. (7,2%) <i>Brachydesmiella</i> sp. (5,1%)  <i>Chloridium</i> sp. (5,1%) <i>Longicollum biappendiculatum</i> (5,1%) <i>Torrentispora</i> sp. 01 (5,1%)
<b>Riqueza (R)</b>	27	36
<b>Shannon-Weaver (H')</b>	2,8167	3,3555
<b>Equitabilidade (E)</b>	0,619318	0,796109
<b>Sorensen (S')</b>	0,2222	

## DISCUSSÃO

A importância do presente estudo concentra-se na diversidade de fungos decompositores de madeira de um ambiente lótico da Amazônia Brasileira e porque avaliou capacidade da metodologia de "iscas de madeira" em descrever a biodiversidade de fungos presentes em madeira naturalmente em decomposição em um igarapé da região amazônica.

A diversidade fúngica das amostras de madeira naturalmente em decomposição e das "iscas de madeira" (metodologia em avaliação) foi grande no presente trabalho. Os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') em ambas comunidades foram maiores que 2,5. Esse resultado corrobora com trabalhos prévios que demonstraram que a metodologia de amostragem de "iscas de madeira", dependendo do ambiente, pode resultar em altos índices de diversidade (Kanel et al. 2002; Sivichai et al. 2000; Sivichai & Jones 2002) .

O presente estudo, utilizando a amostragem experimental (iscas de madeira) apresentou gêneros similares a observados em estudos previamente realizados em outras localizações geográficas como: a) na Inglaterra, no estudo realizado por Kanel et al., (2002), também identificaram os gêneros mitospóricos *Dictyochaeta*, *Monodictys* e *Trichoderma*; b) em estudos realizados na Tailândia por Sivichai et al. (2000) e Sivichai & Jones (2002), os gêneros mitospóricos *Brachydesmiella*, *Cancellidium*, *Cryptophiale*, *Dactylaria*, *Helicosporium*, *Kionochaeta*, *Monodictys*, *Nawawia*, *Sporoschisma*, *Thozetella* e *Xylomyces*, e ainda a espécie meiospórica *Annulatascus aquatorba* também foram identificadas e c) Tsui et al. (2001), em um estudo realizado na China, o gênero meiospórico *Aquaticola* e o mitospórico *Dictyochaeta* Speg. foram também identificadas.

Quanto aos táxons observados na amostragem das madeiras naturalmente em decomposição, deve-se informar que: a) no estudo realizado por Raja et al. (2009), no Estados Unidos da América, esses autores também identificaram os gêneros meiospóricos *Annulatascus* e *Torrentispora*, e ainda, os mitospóricos *Cancellidium*, *Dactylaria*,

*Intercalarispora*, *Sporoschisma* e *Xylomyces* e b) no estudo realizado por Shearer et al. (2015), no Peru, esses autores também identificaram os gêneros meiospóricos *Annulatascus*, *Aquaticola*, *Lasiosphaeria*, *longicollum*, *Lophiostoma*, *Natipusilla*, *Potamomyces* e *Torrentispora* e os gêneros mitospóricos *Brachydesmiella*, *Camposporium*, *Cancellidium*, *Chloridium*, *Dactylaria*, *Pseudobotrytis*, *Sporoschisma* e *Xylomyces*.

A metodologia de "iscas de madeira" não foi capaz de descrever a biodiversidade fúngica das amostras de madeira naturalmente em decomposição no rio. O baixo índice de similaridade Sorensen (0,2222) deixa clara essa incapacidade. Isso deve ocorrer devido: a) a isca de madeira ser originada de uma madeira recentemente cortada apresentando características físicas diferentes da madeira naturalmente em decomposição; b) as madeiras recentemente cortadas possuem extrativos e outras substâncias que servem de substrato para o desenvolvimento de fungos transeuntes do tipo mitospóricos; c) a coleta de madeiras naturalmente em decomposição resulta em fungos associados a madeiras originadas de diferentes espécies vegetais, enquanto que, a amostragem com as "iscas de madeira" utiliza, quase sempre, como no caso do presente trabalho, uma única espécie vegetal e, por fim, d) a coleta de madeiras naturalmente em decomposição resulta em fungos associados a fragmentos de madeira que estão em diferentes momentos de decomposição, enquanto que, quase sempre, como no caso do presente trabalho, a madeira utilizada na metodologia de "iscas de madeira" está em um único momento de decomposição. Esses resultados do presente trabalho corroboram com os descritos Ho et al. (2002) que observaram maior diversidade nos substratos em decomposição natural do que nas "iscas de madeira".

Entre os táxons mais abundantes em ambas as amostragens, dois fungos mitospóricos foram muito frequentes (*Cancellidium applanatum* e *Chloridium* sp.). Isto pode ser devido à sua distribuição ubíqua em climas tropicais como eles têm sido amplamente relatados (Sivichai et al. 2000; Ho et al. 2002; Sivichai & Jones 2002).

O presente trabalho apresenta limitações: a) quanto a identificação dos indivíduos ao nível de espécie (limitação devido à alta frequência de novas espécies); b) a avaliação da metodologia de "iscas de madeira" foi realizada em somente uma localidade e c) no experimento, foi utilizada a madeira de uma espécie vegetal como modelo.

Portanto, o presente estudo demonstrou alta diversidade fúngica nas madeiras coletadas do local de estudo e que o método de "iscas de madeira", nas condições experimentais, não foi adequado para descrever essa diversidade.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores da Universidade de Illinois agradecer ao MCTI pelo apoio no curso início deste projeto, e a Lemann por conceder fundos para continuar esta colaboração. Dr. Huzefa Raja e Carol Shearer agradecemos por sua colaboração. Além disso, muitos cidadãos do Estado do Amazonas permitem acesso aos rios através de sua propriedade privada e estão devidamente reconhecidos.

## REFERÊNCIAS

- Begon M, Townsed CR, L. HJ. 2006 – Ecology from individuals to ecosystems. Fourth. Australia: Blackwell publishing.
- Cai L, Hyde KD, Tsui CKM. 2006. Genera of Freshwater Fungi. 1st ed. Hyde KD, editor. The University of Hong Kong: Fungal diversity Press.
- Cortez ACA, Sanches MA, Zelski SE, Souza, JVB. 2016 – A comparison of the freshwater fungal community during the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 14 (2): 156-161.
- Ho WH, Hyde KD, Hodgkiss IJ. 2002 – Seasonality and sequential occurrence of fungi on wood submerged in Tai Po Kau Forest Stream, Hong Kong. *Fungal Diversity* 10, 21–43.
- Kanel DF, Tam WY, Jones EBG. 2002 – Fungi colonising and sporulating on submerged wood in the River Severn, UK. *Fungal Diversity* 10, 45–55.
- Krebs CJ. 1989 – Ecological Methodology. Second Edi. California: Benjamin Cummings.
- Loureiro AA, Freitas JA, Ramos KBL, Freitas CAA. 2000 – Essências Madeireiras da Amazônia. 4th ed. Ferreira EJG, Fonseca CR V., Oliveira LA, Marques Filho AO, Malta JCO, Santos JMM, Clement CR, Nelson BW, Vasconcelos HL, Vieira G, Silva MF, editors. Manaus: MCT/INPA-CPPF.
- Magurran AE. 2004 – Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell publishing company.
- Monteiro JS, Gusmão LFP, Castañeda-Ruiz RF. 2014 – Two new microfungi from Brazilian Amazon Forest: *Atrogeniculata submersa* and *Nigrolentilocus amazonicus*. *Mycotaxon* 127, 39–45.
- Monteiro JS, Gusmao LFP. 2014 – Two new species of *Ceratosporella* (anamorphic fungi) from Brazilian Amazon forest. *Nova Hedwigia* 98, 481–490.
- Oliveira AN, Amaral IL. 2005. Aspectos florísticos, fitossociológicos e ecológicos de um sub-bosque de terra firme na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 35, 1–16.
- Oliveira AN De, Braule M, Ramos P, Couto LB, Sahdo RM. 2008 – Composição e diversidade florístico-estrutural de um hectare de floresta densa de terra firme na Amazônia. *Acta Amazonica* 38, 627–642.
- Pinto, A.G.N., Silva, M.S.R., Pascoaloto, D. and Santos, H.M.C. 2009. Efeitos da contribuição antrópica sobre as águas do rio negro, na cidade de Manaus, estado do Amazonas. *Caminhos de Geografia*. 10(29):26-32.



- Raja HA, Schmit JP, Shearer CA. 2009 – Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodiversity and Conservation* 18, 419–455.
- Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B. 2011 – *The Genera of Hyphomycetes*. The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Shearer, C.A., Langsam, D.M. and Longcore, J.E. 2004. Fungi in freshwater habitats. In: Mueller GM B, GF FM, eds. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. San Diego: Elsevier. p. 513-531.
- Shearer CA, Zelski SE, Raja HA, Schmit JP, Miller AN, Janovec JP. 2015 – Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. *Biodiversity and Conservation* 24, 1877–1897.
- Sivichai S, Jones EBG. 2002 – Fungal colonisation of wood in a freshwater stream at Tad Ta. *Fungal Diversity* 10, 113–129.
- Sivichai S, Jones EBG, Hywel-Jones NL. 2000 – Fungal colonisation of wood in a freshwater stream at Khao Yai National Park, Thailand. *Fungal Diversity* 5, 71–88.
- Tsui CK, Hyde KD, Hodgkiss IJ. 2001 – Colonization patterns of wood-inhabiting fungi on baits in Hong Kong rivers, with reference to the effects of organic pollution. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 33–38.
- Volkman-Kohlmeier B, Kohlmeier J. 1996 – How to prepare truly permanent microscope slides. *Mycologist* 10, 107–108;

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ As madeiras em decomposição no ambiente lântico estudado apresentaram uma biodiversidade fúngica rica, equilibrada e que sofre influência da sazonalidade (estação chuvosa e não chuvosa).
  
- ✓ *L. biappendiculatum* filogeneticamente apresenta-se como uma espécie que faz parte da família Annulatascaceae *stricto sensu*, sendo um táxon semelhante a *Submersisphaeria aquatica*.
  
- ✓ No ambiente lótico investigado foi observada alta diversidade fúngica nas madeiras coletadas e que o método de "iscas de madeira", nas condições experimentais, não foi adequado para descrever essa diversidade.

## APÊNDICE 1

**Artigo 1-** “A comparison of the freshwater fungal community during the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil”. Esse capítulo foi publicado no *International Journal of Food, Agriculture and Environment*, Vol.14 (2):156-161. (2016).



## A comparison of the freshwater fungal community during the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil

A.C.A. Cortez<sup>1</sup>, M. A. Sanches<sup>2</sup>, S.E. Zelski<sup>3,4</sup> and João Vicente Braga de Souza<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-97, Manaus, Amazonas, Brasil. <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF – Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil. <sup>3</sup> Illinois Natural History Survey, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL 61820. <sup>4</sup> Department of Plant Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Room 265 Morrill Hall, 505 South Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801. \*e-mail: joao.souza@inpa.gov.br, joaovicentebragasouza@yahoo.com.br

Received 15 January 2016, accepted 30 March 2016.

### Abstract

Freshwater fungi are important decomposers of submerged woody and herbaceous debris in aquatic ecosystems. This study compared the biodiversity of the fungal community between the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil. A total of four collections of submerged wood were made over a period of one year (May, August and November 2013, and February 2014). For each collection, 30 pieces of submerged woody debris were collected and examined for fungi to investigate seasonal variation. A total of 264 individual fungi were recorded comprising 25 taxa, of which 16 were meiosporic ascomycetes and 9 were mitosporic ascomycetes. The occurrence of these fungi was recorded and the Shannon-Weiner index ( $H'$ ) was used to evaluate the fungal diversity. The fungal community on woody substrates during rainy months was compared with non-rainy months and had a similarity index of 0.6842. The diversity index was higher in rainy months ( $H' = 2.6012$ ) than in non-rainy months ( $H' = 2.1296$ ) and this may be related to the seasonality of the rainy months due to the leaching phenomenon in the rainy period, although evenness ( $E = 0.600822$ ) was higher in non-rainy months. This study shows that there is a rich and balanced freshwater fungal biodiversity in black water ecosystems. The study also highlights that future studies are needed to improve the limited knowledge of the distribution patterns, ecology, and species identities of freshwater ascomycetes in the aquatic habitats of Northern Brazil.

**Key words:** Amazon, decomposition, diversity, freshwater Ascomycetes, wood.

### Introduction

Aquatic fungi are important decomposers of woody and herbaceous debris in aquatic ecosystems. They are an important contribution to the food chain as a source of food for invertebrates and other fungi<sup>1</sup>. They can be found in various aquatic environments such as oceans and continental waters<sup>2,3</sup>. Continental aquatic ecosystems can be divided into three classes: a) lotic - represented by rivers, creeks, streams and underground aquifers; b) lentic - composed of lakes, swamps and ponds; and c) hybrid or artificial - dams or reservoirs<sup>3,4</sup>.

Detailed studies of freshwater fungi have only been done in the last 50 years<sup>5,6</sup>. To date approximately 3,050 fungal taxa have been reported from aquatic habitats (freshwater and oceanic) belonging to the phyla Ascomycota, Basidiomycota and Chytridiomycota<sup>2</sup>. Fungi from the phylum Ascomycota, saprobic fungi most commonly encountered in aquatic environments, are colonizers of submerged substrates and are thought to be key factors in their decomposition<sup>1</sup>. The most common classes of Ascomycota present in freshwater environments are Dothideomycetes, Orbiliomycetes and Sordariomycetes<sup>7</sup>.

The majority of studies of freshwater ascomycetes in temperate climates has come from North America, Europe, South East Asia and the United Kingdom<sup>5,7</sup>. In tropical climates, studies have mainly been focused in Asia and Australia<sup>8-12</sup>. South America is a geographical area with low sampling effort, with the exception of studies reported in the last decade by Zelski *et al.*<sup>13-16</sup>, Ferrer *et al.*<sup>17</sup>, Raja *et al.*<sup>18</sup> and Shearer *et al.*<sup>7</sup>. In particular, the study of Shearer *et al.*<sup>7</sup> in Peru has expanded our view of the biodiversity of aquatic fungi in neotropical regions. With respect to Brazil, work on the freshwater ascomycetes of the Caatinga has been done by Barbosa *et al.*<sup>19-21</sup> and in the Brazilian Amazon forest by Monteiro and Gusmão<sup>22</sup>. Also in Brazil, work has been done in lentic environments near São Paulo by Shoenlein-Crusius *et al.*<sup>23,24</sup> on aquatic hyphomycetes and these were the first aquatic hyphomycetes documented in Brazil.

The Amazon region has the largest rain forest and freshwater basin in the world and includes the world's largest biodiversity reserve in the world<sup>25</sup>. While the climate favors the proliferation of many microorganisms and fosters a high level of diversity,

much work remains to be done there, especially on aquatic fungi<sup>26</sup>.  
<sup>27</sup>. Freshwater ecosystems of the Amazon basin are diverse. White waters have a high amount of material in suspension from the Andes Mountains, in addition to erosion of the sediment found along the drainage basins. White waters are typically neutral with a pH ~7<sup>28</sup>. Black and clear waters draining the ancient Brazilian and Guiana Shields are poor in dissolved nutrients and are acidic with a pH ~ 4<sup>29</sup>. In such nutrient poor habitats, aquatic fungi are thought to perform the important function of decomposing allochthonous and autochthonous plant material, providing a source of energy at the base of the food chain<sup>30</sup> and thus supporting biodiversity at higher trophic levels<sup>25,31</sup>.

Even with the important ecological role played by freshwater fungi, there is a lack of investigations describing the diversity, ecology, and distribution of these organisms in the Amazon. Studies are necessary in order to understand the function of these organisms, especially the aquatic fungi from lentic and lotic black waters of before these habitats are altered or destroyed. The present work centered on describing and comparing fungal communities during the non-rainy and rainy seasons in a small black water lake in Amazonas, Brazil. The goals of the study were to: A) quantify the number of different taxa present in the rainy season and in the non-rainy season; B) identify as many taxa as possible and C) compare the fungal community composition among the two seasons.

### Materials and Methods

**Study site:** Samples were collected in a lake known "Parque das Águas San Raphael" (3°16'35"S, 60°26 '87"W) located on the highway ~25 km from Iranduba, in Amazonas, Brazil. The origin of the lake came from the damming of a river to build highway 70 AM in the 1970s. The climate is classified as hot and humid and average annual temperature is 25°C with a mean rainfall of 2,300 mm. The rainy season occurs from December to May and the non-rainy season from June to November<sup>32</sup>.

**Water characterization:** The water of "Parque das Águas San Raphael" is dark brown to black in color, has low turbidity and was a suitable site for sample collecting. To characterize the water, data was collected for temperature (°C), pH, electrical conductivity (µ S), transparency (m), oxygen concentration (mg/l) and potential saturation (%). These parameters were measured with a Proflin 197i WTW multiparameter probe (Wellheim, Germany).

**Sample collection:** Four collections of submerged wood samples were made: one in the end of the rainy season of 2013 (May), two during the non-rainy season of 2013 (August and November) and one at the beginning of the rainy season of 2014 (February). Samples were selected based on the methods of Shearer *et al.*<sup>33</sup>. For each season, 60 pieces of submerged woody debris ranging from 6–22 cm long and diameters of 4–15 cm were collected and transported to the Mycology Laboratory at the National Institute for Research in the Amazon (INPA) in sealable plastic bags with moist paper towels. In the laboratory, the samples were rinsed with water and placed in moist chambers (plastic boxes lined with moist paper towels), and incubated at room temperature.

**Morphology identification and isolation of fungi in culture medium:** Over a period of six months, each set of samples was

examined for the presence of fungal reproductive structures using a Stemi DV4 stereomicroscope (Zeiss, Germany). Examination was repeated on a weekly basis. Fungal reproductive structures were transferred to microscope slides containing distilled water, and gently teased apart with sterile dissection needles. Identification of taxa was based on morphology. Mitosporic fungi were identified based on the type of conidiogenesis and the morphology of conidiophores and conidia<sup>34</sup>. When possible, fungi were isolated for future molecular studies on antibiotic water agar (AWA) (agar 20 g/L and chloramphenicol 250 mg/L). Germinated ascospores or conidia were then transferred as pure cultures to peptone yeast glucose agar with antibiotics (PYG+) (peptone 1.25 g/L, yeast extract 1.25 g/L, glucose 5 g/L, chloramphenicol, 250 mg/L and agar 18 g/L)<sup>33</sup>.

**Data analyses:** In this study, an individual was quantified on a per substrate basis. One individual was counted if it was found on a single piece of wood. However, usually multiple taxa were found to colonize individual substrates. The frequency, richness (rate numbers), alpha diversity ( $\alpha$ ), and similarity of fungi were calculated for each season (rainy and non-rainy). To characterize the diversity of the fungal community the Shannon-Weaver diversity index ( $H'$ ) was employed<sup>35</sup>. This index describes diversity with a higher value signifying greater heterogeneity and greater diversity. The formula below was used to perform these calculations:

$$H' = -\sum (p_i) (\ln p_i)$$

$$\text{where } p_{in} = n_i / N$$

$n_i$  = is the individual number of  $i^{\text{th}}$  taxa.  
 $N$  = the individual number of all taxa.

In addition, to interpret the Shannon-Weaver index, an evenness index ( $E$ ) was calculated<sup>36</sup>. This index is the uniformity of the copy number among taxa. The evenness trends towards 0 when one taxon dominates the community, and approaches 1 when the taxa have the same abundance. The index is expressed by the following formula:

$$E = H' / \ln S$$

where  $H'$  = Shannon-Weaver Index based on number of individuals and  $S$  = number of taxa present in the sample.

To evaluate seasonal differences of the fungal communities, the similarity among the samples was calculated using the Sorensen Index ( $S'$ ) with values ranging from 0 (no similarity) to one (absolute similarity). This was calculated using the following formula:

$$S' = 2c/(a+b)$$

where  $a$  = the total number of taxa collected in condition A,  
 $b$  = the total number of taxa collected in condition B,  
 $c$  = the number of common taxa in both conditions.  
 A taxa-area curve was plotted for the four collections to assess sampling effort<sup>37</sup>.

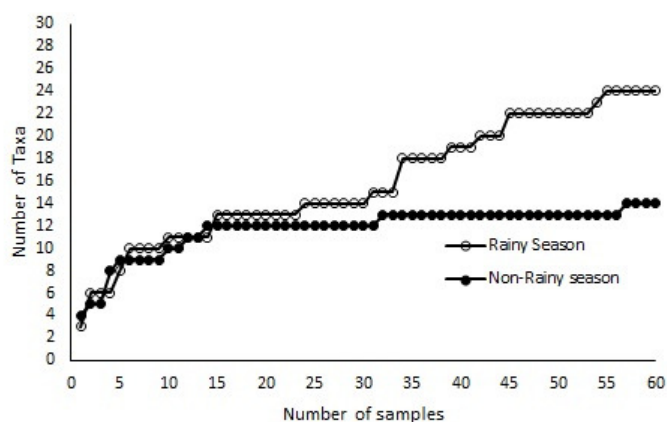
## Results

In order to characterize the habitat, the physicochemical characteristics of the water were analyzed during the rainy season and the non-rainy season. Conditions were similar in both seasons (Table 1).

**Table 1.** Water parameters during the periods of May, August and November 2013 and February 2014 in “Parque das Águas San Raphael” in Iranduba-Amazonas-Brazil.

Period	Rainy season	Non-rainy season
Water temperature (°C)	28.2 ± 0.1	28.9 ± 0.1
pH	4.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1
Electrical conductivity (µS)	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.1
Transparency (m)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Total O <sub>2</sub> (mg/L)	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.1
Saturation potential (%)	55 ± 2	67 ± 1

On these 120 wood samples collected, 264 individual fungi comprised of 25 taxa (16 meiosporic and 9 mitosporic fungi) were observed. The number of taxa observed versus the number of wood samples was analyzed to assess whether the sample size was sufficient to describe the diversity of the lake per season. The taxa accumulation curve shows that after 15 samples the diversity of the non-rainy season was captured, while in the rainy season, after 35 samples the number of new taxa had not reached a plateau (Fig. 1).



**Figure 1.** Taxa accumulation curve of fungi present in the aquatic environment against the number of wood samples.

Table 2 shows the number of individuals and relative abundance of taxa observed in both periods. From collections made in the rainy season with higher rainfall, 130 individual fungi belonging to 24 taxa (15 meiosporic and 9 mitosporic) were recovered. Nine individuals from the meiosporic taxa were identified to level of genus, the rest being potentially new species. Of the nine mitosporic fungi only one taxon was not identified to generic level (unidentified Mitosporic sp. AMMI01). Of the fungi identified, 10 taxa occurred only during the rainy season - 3 meiosporic taxa (*Ascotaiwania* sp. Sivan. & H. S. Chang, *Lasiosphaeria* sp. Cesati & Notaris, and *Flammispora*-like AMME13) and 7 mitosporic taxa (*Brachydesmiella* sp. Arnaud & Hughe, *Brunneodinemasporium brasiliensis* Crous & R. F. Castañeda, *Chloridium* sp. Link, *Dactylella* sp. Grove, *Dendrostilbella* sp. Höhn., *Pseudobotrytis*

*terrestris* (Timonin) Subramanian and *Thozetella* sp. Kuntze) were identified at least to genus level (Table 2). During the less rainy season, 134 individuals were observed belonging to 14 taxa (12 meiosporic and 2 mitosporic). Of the meiosporic species, only one taxa was unique to this season (unidentified Sordariomycetes sp. AMME09). The two mitosporic, *Spinulospora pucciniophila* Deighton and unidentified Mitosporic sp. AMMI01 were encountered only in the rainy season (Table 2).

Results for richness, diversity and evenness of the observed individuals in the rainy season and non-rainy seasons are contained in Table 3. In rainy months, the diversity index (H') and evenness (E) were 2.6012 and 0.561663, respectively. During this period, the 5 most common taxa observed were predominated by (3) meiosporic taxa (Unidentified Dothideomycetes sp. AMME01, Annulatasceae-like sp. nov. AMME12 and unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME04). Non-rainy months had a diversity index (H') of 2.1296 and evenness (E) of 0.600822. In the non-rainy months, meiosporic fungi were also prevalent with 5 taxa (unidentified Dothideomycetes AMME01, *Longicollum biappendiculatum* Zelski, F.R. Barbosa, Raja, A.N. Mill & Shearer, unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME07, unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME04 and *Aquaticola* sp. Ho, K.M.Tsui, Hodgkiss & K.D. Hyde). The Sorensen index of similarity between the seasons which was 0.6842 (Table 3).

## Discussion

Water characteristics from the “Parque das Águas San Raphael” had similar physical and chemical characteristics as those previously described for small black water rivers and lakes of the Amazon region<sup>29, 38–40</sup>. They are acidic (~ pH 4) with low conductivity and low suspended particulate matter. These physicochemical characteristics were similar during both the non-rainy season and the rainy season, suggesting that the measured within lake abiotic environmental factors do not influence species assemblages. The lake is an upland lake and is thus not subjected to the influences of flooding by rivers. Its volume remains fairly constant throughout the year.

This current study reports 25 taxa, 16 of which are meiosporic and 9 mitosporic fungi. These numbers are similar to those of Hu *et al.*<sup>12</sup> in Thailand, though fewer species are reported than in similar studies from China, Australia, and Florida<sup>5, 8–10</sup>. The low number of species may be due to the fact that it is both a small and artificial lake. An artificial lake of similar size was analyzed by Hu *et al.*<sup>12</sup>, which differs from the other studies which were of natural lakes. Comparison of Hu *et al.*<sup>12</sup> and this study shows variation in the number of species among types of lakes. Meiosporic species were present in greater numbers than mitosporic species in both seasons. Comparing the species composition of freshwater fungi between lakes, the study by Hu *et al.*<sup>12</sup> which differs from this study in that there was a greater predominance of mitosporic fungi in that study, and there was little similarity between the identified fungi between seasons.

Three meiosporic fungi in this study were shared with the studies in China - *Ascotaiwania* sp., *Annulatasceae*-like AMME10 and *Lasiosphaeria* sp.<sup>9, 10</sup>. The study of Raja *et al.*<sup>5</sup> shared 6 taxa with this study - 5 meiosporic (*Ascotaiwania* sp., *Annulatasceae*-like AMME10, *Flammispora*-like AMME13, *Fluviatispora reticulata* and *Longicollum biappendiculatum*) and 1 mitosporic (*Thozetella* sp.).

**Table 2.** Number of individuals and relative abundance of taxa observed in samples taken in rainy and non-rainy seasons.

Taxon	Rainy Season May 2013/Feb 2014	%	Non-Rainy Season Aug/Nov 2013	%
<b>Ascomycetes</b>				
Unidentified Dothideomycetes sp. nov. AMME01	27	20.9	40	29.9
<i>Spinulospora pucciniophila</i> Deighton	19	14.7	10	7.4
Unidentified Mitosporic sp. AMMI01	17	13.0	2	1.5
Annulatasceae-like sp. nov. AMME12	9	7	5	3.7
Unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME04	7	5.4	7	5.2
<i>Brunneodinemasporium brasiliensis</i> Crous & R.F. Castañeda	6	4.6	0	0
Unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME07	5	3.8	19	14.3
Unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME08	5	3.8	5	3.7
<i>Flammispora</i> -like AMME13	4	3.0	0	0
<i>Longicollum biappendiculatum</i> Zelski, F.R. Barbosa, Raja, A.N. Mill & Shearer	4	3.0	26	19.5
<i>Thozetella</i> sp. Kuntze	4	3.0	0	0
<i>Chloridium</i> sp. Link	3	2.3	0	0
<i>Dendrostilbella</i> sp. Höhn.	3	2.3	0	0
<i>Dactylella</i> sp. Grove	2	1.6	0	0
<i>Fluviatispora reticulata</i> K.D. Hyde	2	1.6	1	0.7
<i>Natipusilla</i> sp. Ferrer, A.N. Mill. & Shearer	2	1.6	4	3
<i>Potamomyces armatisporus</i> K.D. Hyde	2	1.6	1	0.7
<i>Brachydesmiella</i> sp. Arnaud & Hughe	2	1.6	0	0
<i>Aquaticola</i> sp. Ho, K.M.Tsui, Hodgkiss & K.D. Hyde	2	1.6	7	5.2
<i>Ascotaiwania</i> sp. Sivan. & H. S. Chang	1	0.7	0	0
<i>Lasiosphaeria</i> sp. Cesati & Notaris.	1	0.7	0	0
<i>Pseudobotrytis terrestris</i> (Timonin) Subram.	1	0.7	0	0
Annulatasceae-like AMME03	1	0.7	0	0
<i>Annulatasceus</i> -like AMME10	1	0.7	5	3.7
Unidentified Sordariomycetes sp. AMME09	0	0	2	1.5
<b>Total</b>	<b>130</b>	<b>100</b>	<b>134</b>	<b>100</b>

The greatest diversity occurred during the rainy season although the fungal community was dominated by three taxa: unidentified Dothideomycetes sp. AMME01 (20.9%), *Spinulospora pucciniophila* (14.7%), and unidentified Mitosporic sp. AMMI01 (13.0%). However, even with the dominance of these taxa, the rainy season showed much higher species richness, especially with regard to mitosporic fungi. When both seasons were compared, the Sorenson similarity index (0.6842) revealed an overlap of the fungal communities, but the drier season lacked 11 of the taxa seen in the wetter season. The difference was most profound with the mitosporic fungi, with only 2/9 of the total taxa present in the drier season. A possible explanation for this is that fungi may be washed into the lake during the rainy season from surrounding vegetation or soil, and are thus not indwellers, but rather transient taxa with a short retention time<sup>41</sup>.

The lack of knowledge of freshwater fungi in the Amazon region was a prime motivator of this study to investigate the mycobiota

present in these environments, with a focus on dark waters of the Amazon basin. The results show that there is a rich and balanced biodiversity. This study of the fungi present in a small Amazonian lake increases the knowledge of the dynamics and taxonomy of freshwater fungal taxa in lentic black water habitats and how the community fluctuates through changes in time. This study highlights that future studies are needed to add to the limited knowledge of distribution patterns, ecology, and species identities of freshwater ascomycetes in Northern Brazil.

#### Acknowledgements

The authors from the University of Illinois would like to thank MCTI for support for travel at the initiation of this project, and the LeMann grant for funds to continue this collaboration. Dr. Huzefa Raja, Andrew Miller and Carol Shearer are thanked for their collaboration. Roberto Moreira's aid in collecting is greatly appreciated.



**Table 3.** Comparison of fungal community diversity observed in samples taken in rainy and non-rainy seasons.

Sampling time	Rainy season		Non-rainy season	
	May 2013/ February 2014		August /November 2013	
Sample size	60		60	
Number of Ascomycetes (meiosporic)	73		122	
Number of Ascomycetes (mitosporic)	57		12	
Average number of taxa per sample in seasons	2.16		2.23	
Singleton taxa	5		2	
Overlapping taxa in both seasons			13	
Five most common taxa	Unidentified Dothideomycetes sp. nov. AMME01 (20.9%) <i>Spinulospora pucciniophila</i> (14.7%)		Unidentified Dothideomycetes sp. nov. AMME01 (29.9%) <i>Longicollum biappendiculatum</i> (19.5%)	
	Unidentified Mitosporic sp. AMMI01 (13.0%)		Unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME07 (14.3%)	
	Annulatascaceae-like sp. nov. AMME12 (7.0%)		<i>Spinulospora pucciniophila</i> (7.4%)	
	Unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME04 (5.4%)		Unidentified Sordariomycetes sp. nov. AMME04 and <i>Aquaticola</i> sp. (5.2%)	
Richness (R)	24		14	
Shannon-Weaver (H')	2.6012		2.1296	
Evenness (E)	0.561663		0.600822	
Sorensen (S')	0.6842			

## References

- <sup>1</sup>Simonis, J.L., Raja, H.A. and Shearer, C.A. 2008. Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in fresh water? *Fungal Diversity* **31**:135-146.
- <sup>2</sup>Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thornton, H.A. and Voglymayr, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* **16**(1):49-67.
- <sup>3</sup>Jones, E.B.G. and Pang, K.L. 2012. Tropical aquatic fungi. *Biodiversity and Conservation* **21**(9):2403-2423.
- <sup>4</sup>Nunes, M.V., Ferreira, M.J. and Reginato, R. 2013. Estudo das diferenças das variáveis abióticas de um riacho de pequena ordem e de uma represa. *Fórum Ambiental* **9**:351-359.
- <sup>5</sup>Raja, H.A., Schmit, J.P. and Shearer, C.A. 2009. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodiversity and Conservation* **18**(2):419-455.
- <sup>6</sup>Shearer, C.A. and Raja, H.A. Freshwater Ascomycetes Database. 2015. Available at: <http://fungi.life.illinois.edu/>. Accessed October 13, 1BC.
- <sup>7</sup>Shearer, C.A., Zelski, S.E., Raja, H.A., Schmit, J.P., Miller, A.N. and Janovec, J.P. 2015. Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. *Biodiversity and Conservation* **24**:1877-1897.
- <sup>8</sup>Hyde, K.D. and Goh, T. 1998. Fungi on submerged wood in Lake Barrine, north Queensland, Australia. *Mycol Res.* **102**:739-749.
- <sup>9</sup>Cai, L., Tsui, C.K.M., Zhang, K. and Hyde, K.D. 2002. Aquatic fungi from Lake Fuxian, Yunnan, China. *Fungal Diversity* **9**:57-70.
- <sup>10</sup>Luo, J., Yin, J., Cai, L., Zhang, K. and Hyde, K.D. 2004. Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Diversity* **16**:93-112.
- <sup>11</sup>Hu, D., Cai, L., Chen, H., Bahkali, A.H. and Hyde, K.D. 2010. Four new freshwater fungi associated with submerged wood from Southwest Asia. *Sydowia* **62**(2):191-203.
- <sup>12</sup>Hu, D., Cai, L., Chen, H., Bahkali, A.H. and Hyde, K.D. 2010. Fungal diversity on submerged wood in a tropical stream and an artificial lake. *Biodiversity and Conservation* **19**(13):3799-3808.
- <sup>13</sup>Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N., Barbosa, F.R., Gusmão, L.F.P. and Shearer, C.A. 2011. *Longicollum biappendiculatum* gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete from the Neotropics. *Mycosphere* **2**(5):539-545.
- <sup>14</sup>Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2011. *Chaetorostrum quincemilensis*, gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete and its *Taeniolella*-like anamorph from Peru. *Mycosphere* **2**(5):593-600.
- <sup>15</sup>Zelski, S.E., Balto, J.A., Do, C., Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2014. Phylogeny and morphology of dematiaceous freshwater microfungi from Perú. *IMA Fungus* **5**(2):425-438.
- <sup>16</sup>Zelski, S.E., Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2015. *Conioscypha peruviana* sp. nov., its phylogenetic placement based on 28S rRNA gene, and a report of *Conioscypha gracilis* comb. nov. from Peru. *Mycoscience* **56**(3):319-325.
- <sup>17</sup>Ferrer, A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2011. *Minutisphaera* and *Natipusilla*: two new genera of freshwater Dothideomycetes. *Mycologia* **103**(2):411-423.
- <sup>18</sup>Raja, H.A., Miller, A.N. and Shearer, C.A. 2012. Freshwater ascomycetes: Natipusillaceae, a new family of tropical fungi, including *Natipusilla bellaspora* sp. nov. from the Peruvian Amazon. *Mycologia* **104**(2):569-573.
- <sup>19</sup>Barbosa, F.R., Gusmão, L.F.P., Raja, H.A. and Shearer, C.A. 2008. *Annulatascus apiculatus* sp. nov., a new freshwater ascomycete from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. *Mycotaxon* **106**:403-407.
- <sup>20</sup>Barbosa, F.R., Gusmão, L.F.P., Raja, H.A. and Shearer, C.A. 2013.



- New species and new records of freshwater ascomycetes from Brazil and Costa Rica. *Mycologia* **105**(2):335-343.
- <sup>21</sup>Barbosa, F.R., Raja, H.A., Shearer, C.A. and Gusmão, L.F.P. 2013. Some freshwater fungi from the Brazilian semi-arid region, including two new species of Hyphomycetes. *Cryptogamie Mycologie* **34**(3):243-258.
- <sup>22</sup>Monteiro, J.S. and Gusmão, L.F.P. 2013. An emendation of *Fusticeps* and two new species from the Brazilian Amazon Forest. *Mycotaxon* **123**:431-437.
- <sup>23</sup>Schoenlein-Crusius, I. 2007. O Papel dos Fungos nos Ecossistemas Aquáticos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia* **36**(1):26-30.
- <sup>24</sup>Schoenlein-Crusius, I.H., Moreira, C.G. and Bicudo, D.C. 2009. Aquatic Hyphomycetes in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI, São Paulo, Brazil. *Revista Brasil Bot.* **32**(3):411-426.
- <sup>25</sup>Eiras, J., Takemoto, R., Pavanelli, G. and Adriano, E. 2011. About the biodiversity of parasites of freshwater fish from Brazil. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **31**(4):161-168.
- <sup>26</sup>Rocha, O. 2003. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil- Águas doces. Projeto Estratégia Nacional da Diversidade Biológica (Bra 97 G 31). Available at Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 70 p.
- <sup>27</sup>Souza, A.Q.L., Souza, A.D.L., Astolfi Filho, S., Belém Pinheiro, M.L.P., Sarquis, M.I.M. and Pereira, J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* **34**(2):185-195.
- <sup>28</sup>Queiroz, M.M.A., Horbe, M.A.C., Seyler, P. and Moura, C.A.V. 2009. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil. *Acta Amazonica* **39**(4):943-952.
- <sup>29</sup>Nascimento, C.R. and Silva, M.S.R. 2010. Alterações em parâmetros físicos e em concentrações de cátions e ânions em uma micro-bacia hidrográfica de Manaus devido a expansão urbana. *Caminhos de Geografia* **11**(33):208-219.
- <sup>30</sup>Walker, I. 2009. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Bacia do Rio Negro. Acta Amazonica* **39**(3):617-626.
- <sup>31</sup>Franco-de-Sá, J.F.O. and Val, A.L. 2014. Cooper toxicity for *Scinax ruber* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura) of the Amazon: Potential of Biotic Ligand Model to predict toxicity in urban streams. *Acta Amazonica* **44**(4):491-498.
- <sup>32</sup>Silva, M.L. and Silva, M.S.R. 2007. Hidrogeoquímica das águas subterrâneas da cidade de Iranduba (AM), Brasil. *Caminhos de Geografia* **8**(22):87-96.
- <sup>33</sup>Shearer, C.A., Langsam, D.M. and Longcore, J.E. 2004. Fungi in freshwater habitats. In Mueller, G.M., Bills, G.F. and Foster, M.S. (eds). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, San Diego, pp. 513-531.
- <sup>34</sup>Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W. and Kendrick, B. 2011. *The Genera of Hyphomycetes*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, The Netherlands, 997 p.
- <sup>35</sup>Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. 2<sup>nd</sup> edn. Benjamin Cummings, California, 377 p.
- <sup>36</sup>Magurran, A.E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing Company, Oxford, 215 p.
- <sup>37</sup>Begon, M., Townsend, C.R. and Harper, J.L. 2006. *Ecology from Individuals to Ecosystems*. 4<sup>th</sup> edn. Blackwell Publishing, Australia, 714 p.
- <sup>38</sup>Horbe, A.M.C. and Oliveira, L.G.S. 2008. Química de igarapés de água preta do nordeste do Amazonas - Brasil. *Acta Amazonica* **38**(4):753-760.
- <sup>39</sup>Pinto, A.G.N., Silva, M.S.R., Pascoaloto, D. and Santos, H.M.C. 2009. Efeitos da contribuição antrópica sobre as águas do rio negro, na cidade de Manaus, estado do Amazonas. *Caminhos de Geografia* **10**(29):26-32.
- <sup>40</sup>Aprile, F., Darwich, A.J., Siqueira, G.W. and Santos, F.R.R. 2013. Application of hydrological and limnological studies on building model for water circulation of meromictic black water lakes at the Central Amazonia, Brazil. *International Research Journal of Environment Sciences* **2**(7):58-63.
- <sup>41</sup>Park, D. 1972. On the ecology of heterotrophic micro-organisms in fresh-water. *Transactions of the British Mycological Society* **58**(2):291-299.