

ANA LUCIA DE JESUS

**Diversidade e filogenia de  
Blastocladiomycota, Chytridiomycota e  
Monoblepharidomycota do Mosaico de  
Unidades de Conservação Juréia-Itatins,  
estado de São Paulo, Brasil**

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

SÃO PAULO  
2020

ANA LUCIA DE JESUS

**Diversidade e filogenia de Blastocladiomycota,  
Chytridiomycota e Monoblepharidomycota do  
Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-  
Itatins, estado de São Paulo, Brasil**

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

ORIENTADORA: DRA. CARMEN LIDIA AMORIM PIRES-ZOTTARELLI

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

J58d Jesus, Ana Lucia de  
Diversidade e filogenia de Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Monoblepharidomycota do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, estado de São Paulo, Brasil / Ana Lucia de Jesus -- São Paulo, 2020.  
143p.; il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2020.  
Bibliografia.

1. Diversidade morfológica e molecular. 2. Fungos zoospóricos, sistemática.
3. Ultraestrutura dos zoósporos. I. Título.

CDU: 582.281

*“É preciso que suporte duas ou três larvas, se quiser conhecer as borboletas. ”*

Antoine de Saint-Exupéry

Dedico ao meu querido esposo Eduardo Kenji Yasuda,  
grande admirador e incentivador do meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço,*

À Deus por seu imensurável amor, guiando os meus passos e dando condições para que eu alcance todos os meus objetivos.

À minha querida orientadora Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli, pela amizade e dedicação na realização deste trabalho. Pelo apoio e ajuda prestada durante as coletas e pela paciência e exemplo de profissionalismo que me conduz nestes dez anos trabalhando juntas. Muito obrigada pelas maravilhosas aventuras!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e subsídio por meio da bolsa no período inicial do Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo FAPESP 2016/00697-0) pelo apoio e subsídio por meio da bolsa de Doutorado, e pelo apoio financeiro ao projeto (processo FAPESP 2016/11146-4) “Fungos zoospóricos (sensu stricto e sensu lato) do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, Estado de São Paulo, Brasil: diversidade morfológica e molecular”, sob coordenação da Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao programa do curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela infraestrutura e apoio oferecidos.

Ao Instituto Florestal pelas autorizações concedidas para a realização das coletas no Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins.

Ao gestor do Parque Estadual Itinguçu, uma das unidades do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, Otto Hartung, por toda ajuda prestada durante a organização e a realização das coletas.

Aos funcionários técnicos e guardas-parque do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, pelo acompanhamento e auxílio nas trilhas durante as coletas.

Ao Dr. Gustavo Henrique Jerônimo Alves, pela parceria durante todos estes anos de Instituto de Botânica, pela amizade que construímos e por toda ajuda prestada durante os processos de análises de ultraestrutura. Espero que essa parceria acadêmica continue rendendo bons trabalhos e muitas risadas.

À doutoranda Sarah Cristina de Oliveira da Paixão, pela amizade e apoio durante todos os anos de convivência. Pela palavra amiga nos momentos difíceis, mas principalmente pelos momentos alegres compartilhados. Espero que a nossa amizade e parceria sejam eternas.

Aos meus queridos amigos Dr. Mauro Westphalen e Dra. Viviana Motato Vásquez, por serem únicos e especiais. Pelos ensinamentos e toda risada que compartilhamos durante minha passagem pelo Instituto de Botânica. Pela prazerosa companhia e discussões que possibilitaram novos trabalhos e o enriquecimento pessoal. Que a nossa amizade seja eterna!

À Dra. Marcela Castilho Boro, pela amizade e ajuda prestada durante todos os anos de convivência. Pela prazerosa companhia durante as viagens de congresso e por todos os momentos alegres que compartilhamos. Espero que a nossa amizade e parceria sejam eternas.

À Dra. Agostina Virginia Marano pela amizade dedicada durante os anos de convivência, resistindo a distância, e pelas grandes contribuições que realizou revisando os capítulos desta tese. Espero que possamos voltar a trabalhar juntas novamente!

Ao saudoso Dr. José Ivanildo de Souza (*in memoriam*), pela amizade, pelos ensinamentos e principalmente pelo incentivo no início da realização deste trabalho. Saudades eternas!

Aos meus queridos amigos: Alex Almeida Alcântara, Larissa Bernardino Moro, Leticia Lima, Luiz Antônio Silva Ramos, Mariana de Paula Drewinski, Mariana Fernandes e Ricardo Matheus Pires, pela companhia prazerosa nos congressos, reuniões, apresentações de trabalhos, discussões sobre análises moleculares e nos momentos de descontração que proporcionaram novas descobertas e muitas risadas. Jamais esquecerei esses momentos.

Às bolsistas de Treinamento Técnico do projeto “Fungos zoospóricos (sensu stricto e sensu lato) do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, Estado de São Paulo, Brasil: diversidade morfológica e molecular”, Débora Rodrigues da Silva Colombo e Poliana de Oliveira Ventura, pelo auxílio prestado durante as etapas de extrações, ampliações e purificações do rDNA dos organismos zoospóricos.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Micologia: Dra. Adriana de Mello Gugliotta, Dra. Iracema Helena Schoenlein-Crusius, Marli Gomes Lima do Nascimento, Dr. Michel Navarro Benatti, Dr. Nelson Menolli Junior, Rosimeire Inácio, Shirlei Soares Dassi, Dra. Vera Maria Valle Vitali, pelo carinho e pela boa convivência ao longo desses anos.

À minha saudosa avó Anna Maria do Carmo (*in memoriam*), pelo exemplo de vida que me auxilia a correr atrás dos meus sonhos. Saudades eternas!

Aos meus queridos pais José Carlos de Jesus e Ana Maria de Camargo Jesus por todo amor e compreensão que me dedicam. Não teria conseguido sem vocês!

Aos meus queridos irmãos Ciro, Luciano e Bruna, e aos meus queridos sobrinhos Tainá, Mateus, Ana Clara, José Carlos, João Miguel e Eloah, por fazerem parte da minha vida, por serem amor até nos momentos de ausência. Amo todos vocês!

Aos meus queridos tios José Fernando de Camargo e Ângela Maria de Moraes Camargo pela alegria que me recebem quando volto para casa e pela torcida em todos os momentos da minha vida. Vocês são especiais!

À minha querida prima Simone de Camargo Gomes pela amizade, incentivo e torcida para que tudo sempre ocorra bem. Obrigada pelas inúmeras orações.

Ao meu amor Eduardo Kenji Yasuda, pela paciência, compreensão nos momentos de ausência e admiração do meu trabalho. Pela força e incentivo nos momentos mais difíceis e por todo amor e carinho que sempre me dedica. Te amo para sempre!



Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ana Lucia de Jesus

## RESUMO

Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota e Rozellomycota são filos pertencentes ao Reino Fungi, cujos representantes atuam como sapróbios e/ou parasitas nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Embora muitas espécies sejam decompositoras especialmente de substratos celulósicos, queratinosos, quitinosos e esporopolenina, algumas se destacam como importantes parasitas de algas, plantas e animais. Estes fungos possuem em comum um flagelo liso, posteriormente inserido no esporo (zoósporo), necessitando de água para completar o seu ciclo de vida, podendo muitas vezes sobreviver por longo período de tempo em condições adversas por meio de estruturas de resistência. No Brasil, estudos com estes filos são ainda poucos, se considerarmos a dimensão do país e o restrito número de especialistas. De aproximadamente 1.200 espécies descritas, somente 134 foram até agora registradas no país. Quando consideramos as sequências gênicas das espécies, o quadro mundial é ainda mais preocupante, pois com escassos pesquisadores trabalhando com estes grupos, pouco até agora está disponível em bancos de dados gênicos. Diante disso, este estudo teve como objetivo principal avaliar a riqueza e a diversidade dos fungos zoospóricos pertencentes aos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Monoblepharidomycota, nos ecossistemas aquáticos e terrestres do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins. Para isto, quatro coletas foram realizadas de agosto/2016 a outubro/2017, onde foram coletadas quantidades padronizadas de solo, e de água, folhas submersas e sedimento do fundo de corpos d' água, de diferentes locais. As amostras foram plaqueadas em laboratório, iscadas pela técnica de iscagem múltipla e incubadas de 7 a 30 dias, onde foram analisadas com auxílio de microscopia ótica. De 185 amostras (45 amostras de água, 45 de sedimento de fundo, 45 de folhas submersas, 45 de solo e 5 de frutos submersos - maçã), 47 espécies foram identificadas (02 Blastocladiomycota, 02 Monoblepharidomycota e 43 Chytridiomycota), com 19 delas isoladas em meio de cultura pura e/ou em iscas puras, permitindo o sequenciamento das regiões ITS, LSU e/ou SSU do nuc rDNA, as quais foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas. As análises morfológicas e filogenéticas revelaram um gênero novo, três novas espécies, bem como cinco novas citações para o país. Além disso, foi realizada a técnica de ultraestrutura de zoósporos, em três das espécies identificadas, a qual auxiliou no estabelecimento de novos táxons e/ou novas classificações taxonômicas dentro de Chytridiomycota. De maneira geral, este estudo contribuiu não só para a ampliação do conhecimento da diversidade de fungos zoospóricos brasileira, como também para a diversidade mundial, desde que as análises morfológicas, moleculares e/ou ultraestruturais destes organismos evidenciaram novos táxons para a ciência. Ao lado disso,

permitiu o enriquecimento de bancos de dados gênicos, a partir da disponibilização de sequências gênicas de isolados brasileiros.

**Palavras-chave:** diversidade morfológica e molecular, fungos zoospóricos, sistemática, ultraestrutura dos zoósporos.

## ABSTRACT

Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota and Rozellomycota are phyla belonging to kingdom Fungi, which can be found as saprobes and /or parasites in aquatic and terrestrial ecosystems. Many species are especially decomposers of the cellulosic, chitinous and keratinous substrates, as well as sporopollenin, and some of them are important parasites of algae, plants and animals. These fungi have in common a posterior whiplash flagellum in the spore (zoospore), requiring water to complete its life cycle, and often survive for long period of time under adverse conditions through the production of resistance structures. In Brazil, studies with these phyla are still few, considering the size of the country and the limited number of specialists. Of approximately 1.200 described species, only 134 were registered in this country. When we consider the gene sequences of the species, the global picture is still worrying, because there are few researchers working with these groups and consequently a few numbers of sequences are available in GenBank. Therefore, this study had as its main objective, evaluate the richness and the diversity of zoosporic fungi belonging to Blastocladiomycota, Chytridiomycota and Monoblepharidomycota phyla, from aquatic and terrestrial ecosystems at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”. For this, four sampling were performed from August/2016 to October/2017, where were collected soil samples, and water, submerged leaves and surface sediment samples from freshwater bodies, in different locations. The samples were plated in the laboratory, baited with the multiple baiting technique and incubated for 7–30 days, which were analyzed with the optical microscopy. From 185 samples (45 water samples, 45 surface sediment samples, 45 submerged leaves samples, 45 soil samples and 5 submerged fruits – apple), 47 taxa were identified, being 19 species isolated in pure culture medium and/or in pure baits, allowing the sequencing of the ITS, LSU and SSU of the nuc rDNA and the construction of the phylogenetic trees. The morphological and phylogenetical analyses revealed a new genus, three new species for science and five new records for Brazil. In addition, was performed the zoospore ultrastructure technique in the three identified species, which assisted in the establishment of new taxa and/or new taxonomical classification within Chytridiomycota. In general, this study contributes not only to the expansion of the knowledge of the diversity of Brazilian zoosporic fungi, but also to the worldwide diversity, since the morphological, molecular and/or ultrastructural analyzes of these organisms showed new taxa for science. In addition, it allows the enrichment of gene databases by providing gene sequences from Brazilian isolates.

**Key words:** morphological and molecular diversity, zoosporic fungi, systematic, zoospore ultrastructure

# Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. Objetivo geral .....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. HIPÓTESES .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1. Área de estudo .....	19
4.2. Amostras coletadas.....	20
4.3. Tratamento das amostras .....	24
4.4. Fatores abióticos mensurados nos locais de coleta .....	26
4.5. Isolamento e identificação.....	27
4.6. Análise da comunidade .....	27
4.7. Obtenção de culturas puras.....	28
4.8. Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do rDNA.....	28
4.8.1. Produção de biomassa e extração de DNA .....	28
4.8.2. Amplificação e purificação do DNA .....	29
4.8.3. Sequenciamento .....	29
4.8.4. Tratamento das sequências.....	29
4.9. Análises filogenéticas.....	29
4.10. Análise de ultraestrutura dos zoósporos .....	30
4.11. Teste de crescimento .....	32
4.12. Preservação .....	33
4.12.1. Culturas e lâminas semipermanentes .....	33
4.12.2. Criopreservação dos isolados .....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1. Caracterização dos fatores abióticos nos locais de coleta .....	33
5.2. Isolamento e identificação dos fungos zoospóricos.....	34
5.3. Análises filogenéticas.....	35
5.3.1. Sequências de bases nucleotídicas .....	35
5.3.2. Análises filogenéticas de espécimes que não foram incluídos nos capítulos apresentados nesta tese .....	36
5.4. Análises de ultraestrutura dos zoósporos.....	40
5.5. Teste de Crescimento .....	41
5.6. Preservação dos espécimes obtidos .....	43
5.7. Capítulos apresentados nesta tese.....	46
CAPÍTULO I .....	47

<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>87</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>118</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>131</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota e Rozellomycota, também conhecidos como fungos zoospóricos, são filós de posição basal na filogenia do reino dos fungos (James *et al.* 2006a, Hibbett *et al.* 2007, Tedersoo *et al.* 2018). A principal similaridade entre os representantes destes filós está na produção de esporos móveis (zoósporos), com um único flagelo liso, posteriormente inserido, o que permite sua dispersão ativa nos mais diversos ecossistemas.

Embora todos os fungos compartilhem de um ancestral comum na filogenia do Reino Fungi, as linhagens que deram origem aos fungos zoospóricos são divergentes. Rozellomycota, por exemplo, representa a linhagem mais basal de todo o reino, sendo divergente também da linhagem que deu origem aos demais filós de fungos zoospóricos (Tedersoo *et al.* 2018). Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 1.200 espécies de fungos zoospóricos (James *et al.* 2006a, Power & Letcher 2014a, Tedersoo *et al.* 2018), sendo Chytridiomycota o primeiro filo descrito, agregando todos os fungos com esporos flagelados (Barr 2001). Há quase duas décadas, com a inclusão das análises moleculares e de ultraestrutura dos zoósporos, a compreensão das relações evolutivas vem se modificando e novos caracteres têm sido considerados na análise da origem e da divergência destes fungos, o que resultou na segregação em seis filós de fungos zoospóricos (James *et al.* 2006a, Hibbett *et al.* 2007, Powell & Letcher *et al.* 2014a, Tedersoo *et al.* 2018).

Blastocladiomycota, criado a partir da ordem Blastocladales do Filo Chytridiomycota, possui duas classes, Blastocladiomycetes e Physodermatomycetes, e duas ordens, Blastocladales e Physodermatales, com aproximadamente 180 espécies descritas (James *et al.* 2006a, b, Tedersoo *et al.* 2018). Os representantes deste filo possuem zoósporos com capa nuclear proeminente, e alguns deles, ciclo de vida com alternância de gerações haploides e diploides, sendo essas características exclusivas do filo.

Neocallimastigomycota, proposto por Hibbett *et al.* (2007), possui uma classe, Neocallimastigomycetes, e uma ordem, Neocallimastigales, com aproximadamente 21 espécies. O filo agrega, além de espécies com zoósporos uniflagelados, espécies com zoósporos poliflagelados (podendo chegar até 20 flagelos), sendo observada essa variação até mesmo dentro de uma mesma espécie, como exemplo *Neocallimastix frontalis* (R.A.



Braune) Vavra & Joyon ex I.B. Heath, que possui zoósporos com 8 a 17 flagelos (Gruninger *et al.* 2014, Powell *et al.* 2014a).

Monoblepharidomycota, nesta tese considerada a grafia sugerida por Powell *et al.* (2014a), foi elevada a filo por Doweld (2001) considerando características morfológicas e filogenéticas. Mesmo com as evidências apresentadas por Doweld (2001), o filo possui posição incerta, não sendo totalmente aceita como filo por muitos pesquisadores, como Dee *et al.* (2015) e Karpov *et al.* 2017. Recentemente, Tedersoo *et al.* (2018) propuseram uma nova classificação para o reino dos fungos, utilizando como principais ferramentas o tempo de divergência evolutiva entre os grupos e o critério monofilia entre os filós. Nesta nova classificação, Monoblepharidomycota é apresentada como um filo irmão de Chytridiomycota e Neocallimastigomycota, estando representado por três classes, Monophlepharidomycetes, Hyaloraphidiomycetes e Sanchytriomycetes, com aproximadamente 37 espécies descritas (Karpov *et al.* 2017, Tedersoo *et al.* 2018). Espécies dos gêneros *Olpidium* e *Rozella*, que se encontravam incertos dentro da filogenia dos fungos, também foram analisados e reclassificados por Tedersoo *et al.* (2018), sendo elevados a filós, Olpidiomycota e Rozellomycota, respectivamente.

Chytridiomycota, mesmo após a segregação dos filós, ainda é o maior dentre os fungos zoospóricos, com aproximadamente 950 espécies, distribuídas em sete classes, Chytridiomycetes, Cladochytriomycetes, Mesochytriomycetes, Lobulomycetes, Polychytriomycetes, Rhizophlyctidomycetes, Rhizophyidiomycetes, Spizellomycetes e Synchronytriomycetes.

Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Monoblepharidomycota, filós estudados nesta tese, possuem alta plasticidade morfológica, apresentando talo monocêntrico, policêntrico ou micelial, presença ou ausência de opérculo para liberação dos zoósporos, zoosporângios que produzem esporos assexuados e estruturas de resistência com origem sexuada ou assexuada (James *et al.* 2006a, Powell & Letcher 2014a). São considerados cosmopolitas, podendo seus representantes serem encontrados geralmente como sapróbios nos diferentes ecossistemas aquáticos e terrestres. Alguns táxons podem ser mais frequentemente isolados de ambientes aquáticos, enquanto outros de ambientes terrestres (Powell & Letcher 2014a), sendo capazes de sobreviverem a condições ambientais adversas por meio de suas estruturas de resistência, as quais permitem que fiquem por um longo período em estado de repouso (Powell 1993). Embora a maioria das espécies seja decompositora de substratos celulósicos, queratinosos, quitinosos, incluindo materiais recalcitrantes como esporopolenina, algumas se destacam como parasitas

obrigatórias de plantas vasculares, como *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival, responsável pela verruga da batata. Há também algumas espécies parasitas de algas, insetos e anfíbios, com destaque para as espécies do gênero *Batrachochytrium* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (*B. dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols e *B. salamandrivorans* Martel A., Blooi M., Bossuyt F. & Pasmans F.), responsáveis pelo declínio de anfíbios ao redor do mundo (Shearer *et al.* 2007, Martel *et al.* 2013, James *et al.* 2015, Simon *et al.* 2018).

Os representantes destes filos vêm passando por constantes reconstruções filogenéticas considerando as sequências de genes do DNA ribossomal e as características ultraestruturais dos seus zoósporos (Barr 1980, James *et al.* 2000, 2006a, b, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Powell & Letcher 2012, Letcher & Power 2014). O primeiro estudo que evidenciou a importância da microscopia eletrônica na taxonomia dentro do grupo, tendo em vista a arquitetura estrutural dos zoósporos, foi realizado por Koch (1958). O autor observou a diversidade entre as espécies de fungos zoospóricos, mas somente em 1961 descreveu os primeiros tipos estruturais de zoósporos, apresentando consideráveis informações para a compreensão e distinção filogenética destes grupos (Barr 1980, 1984). Estes filos apresentam uma enorme diversidade fenotípica, sendo capazes de se adaptar a diversos ambientes, dificultando, muitas vezes, sua identificação apenas pela morfologia. As duas principais regiões dos zoósporos, ricas em caracteres informativos, são o aparelho flagelar e o complexo dos microcorpos lipídicos (Powell & Letcher 2014a). Esses autores ressaltaram também que as características ultraestruturais são mais informativas para altos níveis taxonômicos, sendo menos informativas para gênero e espécies (Powell & Letcher 2012).

Estudos com base em sequências gênicas e características ultraestruturais dos zoósporos dos fungos zoospóricos vêm sendo especialmente desenvolvidos com isolados da América do Norte (James *et al.* 2000, 2006, Mozley-Standridge *et al.* 2009, Letcher & Power 2014, Powell & Letcher 2014 a,b), o que tem permitido o entendimento da relação evolutiva entre os fungos zoospóricos e entre esses e os demais fungos, desde que são considerados de posicionamento basal na filogenia, e importantes para a reconstrução da árvore filogenética dos fungos (Powell & Letcher 2014b). Na América do Sul, estudos baseados na filogenia e na ultraestrutura dos zoósporos estão resumidos em poucos trabalhos, com isolados provenientes da Argentina (Letcher *et al.* 2008, Velez *et al.* 2011, 2013). Esses autores revisaram a família Chytridiaceae e descreveram dois novos gêneros para a família Chytriomycetaceae (*Avachytrium* e *Odontochytrium*), e um novo gênero,

*Delfinachytrium* em posição *incertae sedis*, além de revisar a ordem Rhizophydiales. As primeiras sequências de isolados brasileiros foram recentemente incorporadas no GenBank, provenientes de estudos realizados em áreas de Mata Atlântica, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Jesus *et al.* 2013) e Parque Estadual da Ilha do Cardoso (Jerônimo *et al.* 2015), bem como em reservatórios da Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Rio Tietê (Jerônimo *et al.* 2019a, b). Os estudos, com importantes resultados obtidos por meio de análises moleculares e ultraestruturais, confirmaram a reestruturação taxonômica de alguns táxons (Jerônimo *et al.* 2019a, b), sendo estes dados relevantes para futuros estudos e para o entendimento da variabilidade genética entre espécimes de uma mesma espécie.

No Brasil são conhecidas 17 espécies de Blastocladiomycota, 101 espécies de Chytridiomycota e quatro espécies de Monoblepharidomycota, com a maioria delas citadas para o estado de São Paulo (63%) (Maia & Carvalho 2015, Jerônimo *et al.* 2019a, b), onde se encontra o maior número de especialistas no grupo. Os estudos taxonômicos foram realizados principalmente em regiões de Mata Atlântica (Beneke & Rogers 1962, 1970, Rogers *et al.* 1970, Lyra & Milanez 1974, Milanez *et al.* 1994, Pires-Zottarelli *et al.* 1996, Pires-Zottarelli 1999, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2010, Jesus *et al.* 2013, Jerônimo *et al.* 2015, entre outros); no entanto, para o Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, importante área de conservação ambiental, não havia nenhum relato da ocorrência destes fungos. Para esta área havia somente citações de fungos anamórficos de água e solo (Attili 1994, Garlip 1995, Grandi & Attili 1996, Prada & Pagnocca 1997), de leveduras (Pinto 1999) e de basidiomicetos, especificamente *Aphyllophorales* (Tauk Tornisielo *et al.* 2000).

Considerando-se a situação de degradação das áreas de Mata Atlântica, exaustivamente citada em literatura, a qual vem se estendendo cada vez mais pela desenfreada falta de conscientização e de proteção dos habitats, a relevância deste bioma para o Brasil e para o estado de São Paulo, a inexistência de estudos com fungos zoospóricos no Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, e a ainda escassez de sequências gênicas de isolados brasileiros nos bancos de dados, o presente estudo visou avaliar a riqueza e a diversidade de fungos zoospóricos dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Monoblepharidomycota nos ecossistemas aquáticos e terrestres em diferentes áreas do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, ampliando assim

o conhecimento destes grupos de fungos no país e no mundo, por meio de novas citações e/ou descrição de novos táxons.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a riqueza e a diversidade de fungos zoospóricos presentes nos ecossistemas aquáticos e terrestres do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, de forma a ampliar o conhecimento no país e contribuir com os estudos morfológicos, filogenéticos e/ou de ultraestrutura dos zoósporos de isolados brasileiros.

### **2.2. Objetivos específicos**

(i) Estudar a riqueza e a diversidade dos fungos zoospóricos dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Monoblepharidomycota presentes nos diferentes ambientes aquáticos e terrestres do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins;

(ii) Comparar a riqueza e a diversidade de espécies obtidas nos diferentes compartimentos;

(iii) Identificar as espécies mediante caracterização morfológica e molecular (regiões SSU, ITS total e LSU do rDNA), bem como ampliar a oferta de informação molecular de isolados brasileiros;

(iv) Ampliar o acervo da CCIBt (Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica) por meio da inclusão de espécimes de fungos zoospóricos;

(v) Disponibilizar dados ultraestruturais dos zoósporos de espécimes brasileiros, previamente selecionados, no intuito de resolver problemáticas de classificação em sua posição filogenética.

## **3. HIPÓTESES**

(i) Embora a Mata Atlântica seja o bioma mais estudado no Brasil, ainda há uma diversidade desconhecida em áreas não exploradas;

(ii) O solo apresentará maior riqueza e diversidade de espécies;

(iii) A obtenção e a inclusão de dados moleculares de isolados brasileiros nas análises filogenéticas podem modificar a topologia dos grupos de Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Monoblepharidomycota;

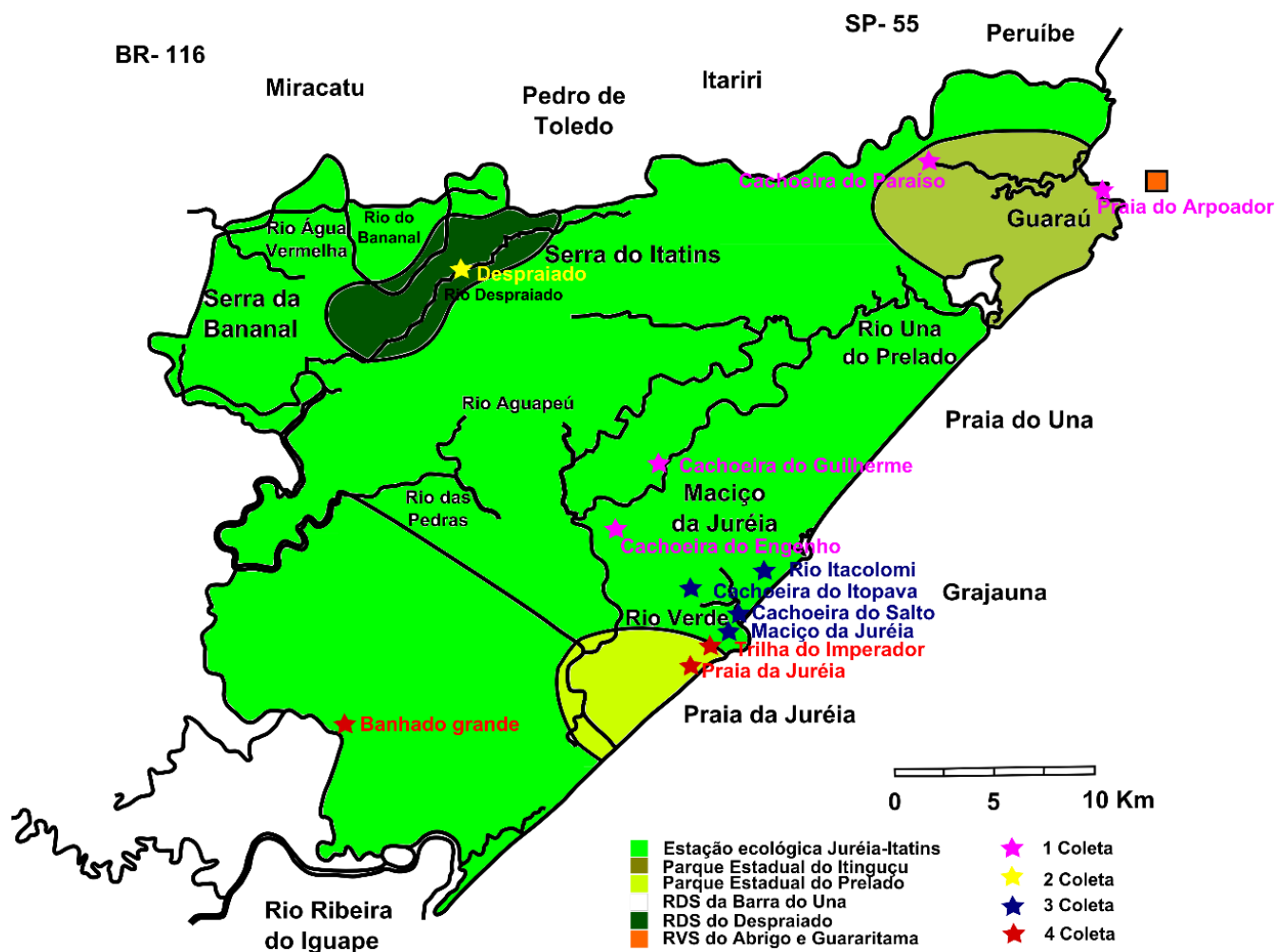
(iv) Dados ultraestruturais associados aos moleculares podem direcionar novas classificações e/ou mudanças taxonômicas em táxons ainda não estudados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Área de estudo**

Este estudo foi realizado no Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, o primeiro mosaico de áreas protegidas de Mata Atlântica, o qual é contemplado por diferentes categorias de Unidades de Conservação (UC): Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI) com 84.425ha, Parque Estadual de Itinguçu com 5.040ha, Parque Estadual do Prelado com 1.828ha, e Reservas de Desenvolvimento Sustentável (RDS) do Despraiado com 3.953ha e da Barra do Una com 1.487ha (São Paulo 2009, Sanches 2016). Localizada entre os municípios Iguape, Itariri, Miracatu, Pedro de Toledo e Peruíbe, a área é administrada pelo Instituto Florestal da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Figura 1).

O Mosaico, implantado em dezembro de 2006 (Lei 12.406), apresenta topologia bastante irregular entre morros, serras, planícies e praias (Souza & Souza 2004, Tarifa 2004), sendo o clima da região classificado como subtropical permanentemente úmido, sem estação seca definida, com temperatura média anual de 21,4°C e pluviosidade média anual de 2.277,8 mm (Tarifa 2004, São Paulo 2009).

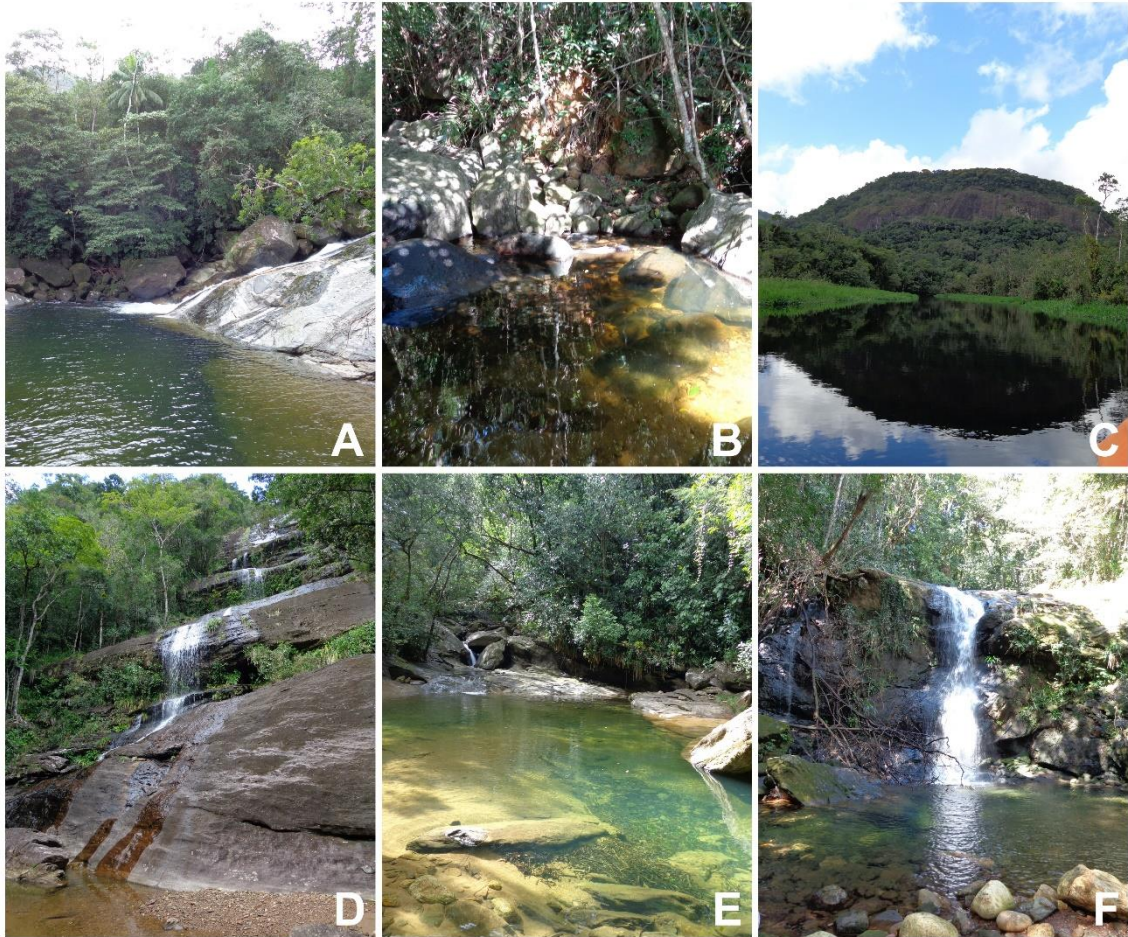


**Figura 1.** Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins: categorias, núcleos e áreas de coleta. Figura adaptada de Souza & Souza 2004.

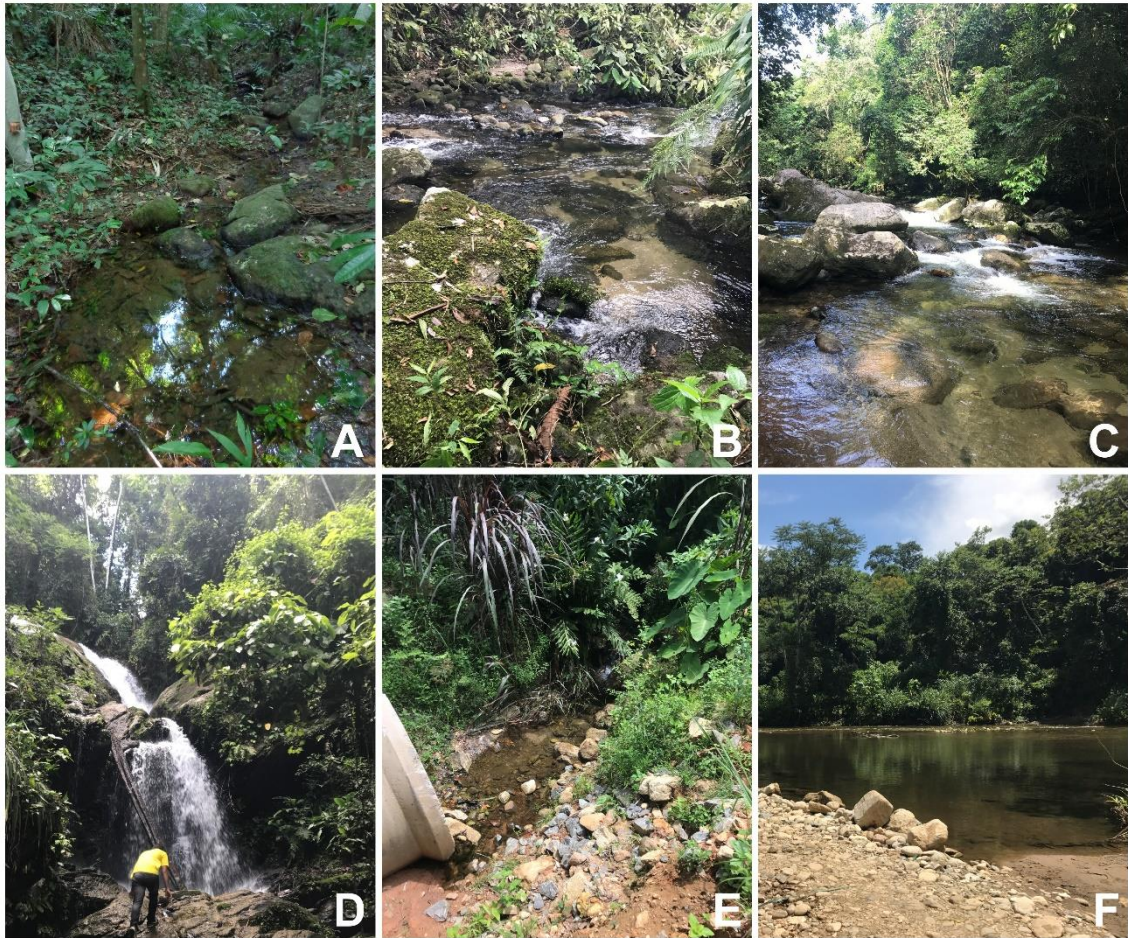
#### 4.2. Amostras coletadas

Entre Agosto de 2016 e Outubro de 2017 foram realizadas quatro coletas (Agosto/16 – 1ª coleta, Fevereiro/17 – 2ª coleta, Junho/17 – 3ª coleta e Outubro/17 – 4ª coleta) em áreas de Mata Atlântica do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins. Destas áreas, cinco núcleos foram amostrados: Núcleos Arpoador, Despraiado, Itinguçu, Praia da Juréia, Rio Verde, além de algumas áreas da Estação Ecológica da Juréia-Itatins (Figuras 2-5). Em cada local de coleta foram coletadas quantidades padronizadas de (i) água (aprox. 200 mL), (ii) folhas submersas (aprox. 100 g), sedimento de fundo (aprox. 100 g) de rios, riachos e cachoeiras, e solo (aprox. 500 g), totalizando 185 amostras (45 de água, 45 de solo, 45 de sedimento de fundo, 45 de folhas submersas e 5 frutos submersos). As amostras de água, folhas submersas e sedimento foram colocadas em potes plásticos (200 mL), sendo as amostras de folhas e sedimento umedecidas com água

esterilizada autoclavada no momento da amostragem. As amostras de solo, de locais normalmente próximos aos corpos d' água amostrados, após a remoção da serapilheira, foram coletadas com auxílio de uma pá e acondicionadas em sacos plásticos. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório em caixa térmica, contendo gelo reciclável para evitar a dessecação e aumento excessivo de temperatura.

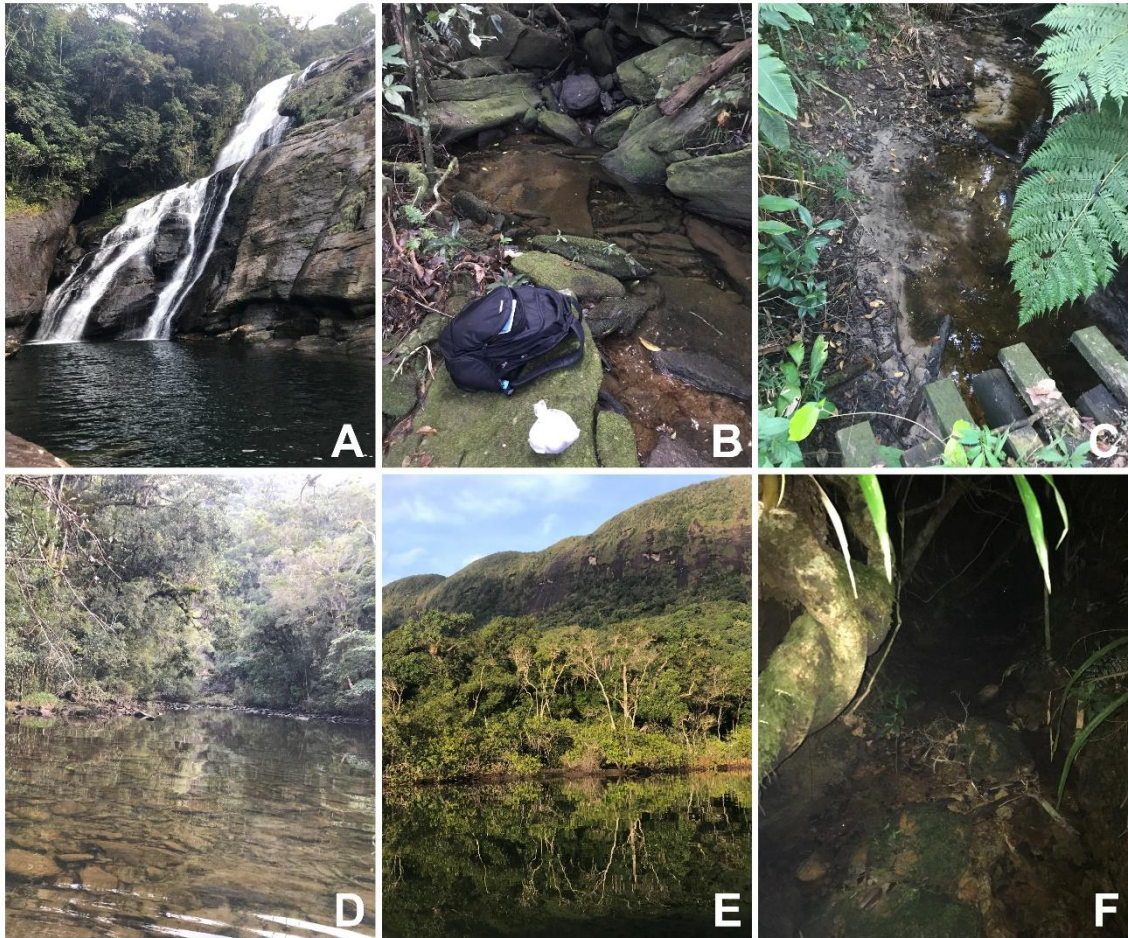


**Figura 2A-F.** Corpos d' água amostrados na primeira coleta. A. Cachoeira do Paraíso - Núcleo Itinguçu. B. Corredeiras na praia do Arpoador - Núcleo Arpoador. C. Rio Una- Estação Ecológica Juréia Itatins. D-E. Cachoeira do Guilherme - Estação Ecológica Juréia-Itatins. F. Cachoeira do Engenho - Estação Ecológica Juréia-Itatins.



**Figura 3A-F.** Corpos d'água amostrados na segunda coleta (Núcleo Despraiado). A. Corredeiras da cachoeira do Despraiado (atrás da sede do núcleo). B. Rio Pernambuco. C. Cachoeira do Despraiadão. D. Cachoeira do Pastor Raimundo. E. Riacho que desemboca nas corredeiras da Cachoeira do Despraiado. F. Rio do Dino.





**Figura 4A-F.** Corpos d'água amostrados na terceira coleta (Núcleo Rio Verde). A-B. Cachoeira do Salto. C. Rio Itacolomi. D. Rio Verde. E. Vista do Maciço da Juréia. F. Riacho na porção mais alta do Maciço da Juréia (aprox. 800 metros de altitude).



**Figura 5A-F.** Corpos d'água amostrados na quarta coleta. A. Riacho no banhado grande - Estação Ecológica Juréia-Itatins. B-E. Cachoeiras na trilha do Imperador - Estação Ecológica Juréia-Itatins. F. Riacho da sede - Núcleo Praia da Juréia.

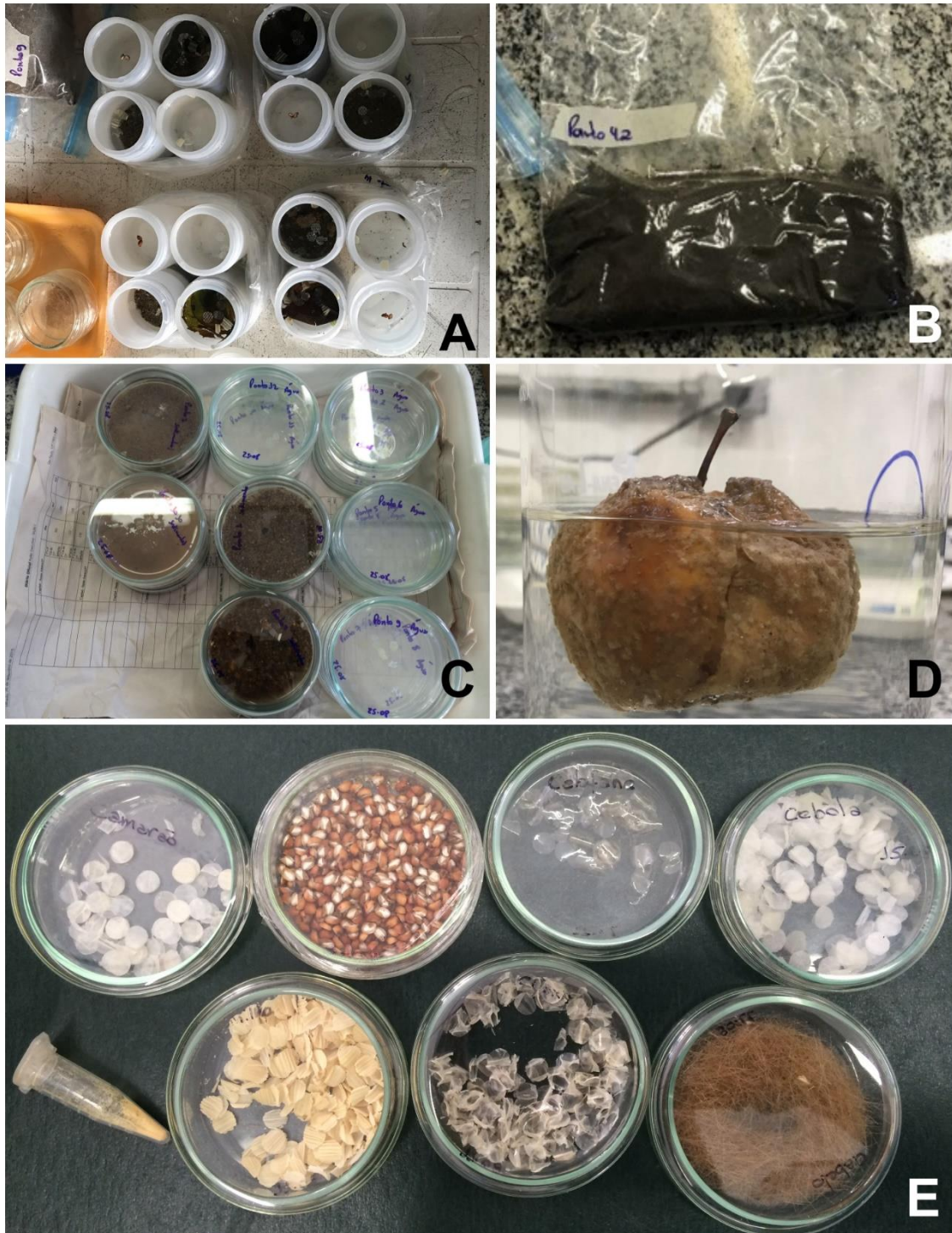
### 4.3. Tratamento das amostras

Alíquotas de água (30 mL) foram iscadas em campo, utilizando-se a técnica de iscagem múltipla que consiste em adicionar substratos celulósicos (sementes de *Sorghum* sp. autoclavadas, palha de milho, celofane, epiderme de cebola), queratinosos (ecdise de cobra e fios de cabelo loiro de criança) e quitinoso (exoesqueleto de camarão), bem como grãos de pólen de *Pinus* sp., conforme metodologia descrita em Milanez (1989). O restante das amostras (folhas submersas, sedimento e solo) foram iscadas, em laboratório, por meio da mesma técnica. De cada local foram preparadas duas placas, uma onde foram adicionadas as metades de sementes de *Sorghum* sp., e na outra, as outras iscas, de modo a evitar a competição com os oomicetos, que normalmente colonizam as sementes com muita rapidez e facilidade, formando extensas colônias. Com exceção dos grãos de pólen, cabelo loiro de criança e sementes de *Sorghum* sp., as demais iscas foram padronizadas em 0,6 cm de diâmetro, e dois fragmentos de cada isca por amostra.

Alíquotas das amostras de folhas coletadas (aprox. 10g), previamente cortadas em pequenos pedaços, foram colocadas em placas de Petri com água esterilizada autoclavada (30 mL), e as de sedimento (15g) e de solo (15g) diretamente colocadas em placas de Petri com água esterilizada autoclavada (30 mL). Parte do solo coletado (15 g) foi seca a 40°C por sete dias, quando se procedeu o plaqueamento juntamente com água esterilizada autoclavada (30 mL) e sementes de *Sorghum* sp., visando a obtenção e facilitação do crescimento de representantes do gênero *Allomyces* (Blastocladiomycota).

Todas as placas com as amostras foram mantidas em laboratório (aprox. 22°C) e as iscas observadas com 7, 14, 21 e 30 dias de incubação, sob microscópio óptico, para detecção da presença de espécimes de fungos zoospóricos.

Nas duas últimas coletas (junho e outubro/2017) foi também utilizada a técnica de iscagem de fungos zoospóricos por meio de frutos submersos (Milanez 1989), onde foram colocados frutos de *Malus* sp. (maçã) em corpos d'água de dois locais de coleta (menos expostos ao público), os quais ficaram submersos por 30 dias dentro de recipientes de plástico perfurados para permitir a entrada de água (obs.: esta técnica, embora bastante eficiente para a iscagem de alguns representantes de Blastocladiomycota e Monoblepharidomycota, é bastante difícil de ser utilizada, pois os recipientes normalmente são furtados ou jogados fora por visitantes). Após este período, os frutos foram retirados dos corpos d' água e acondicionados em sacos plásticos em caixa térmica. Em laboratório, os frutos foram colocados em beakers (1 L), com água esterilizada autoclavada, sob aeração constante, com auxílio de bombas de aquário. As pústulas de fungos zoospóricos formadas nos frutos foram observadas até a completa identificação dos espécimes presentes (Figura 6).



**Figura 6 A-E.** A. Amostras coletadas em potes plásticos (água, folhas submersas e sedimento). B. Amostra de solo coletada em saco plástico (Ziplock). C. Amostras iscadas em placas de Petri. D. Fruto submerso (maçã) em aeração. E. Iscas utilizadas na técnica de iscagem múltipla.

#### 4.4. Fatores abióticos mensurados nos locais de coleta

Para a caracterização abiótica da água foram mensurados, nos diferentes locais de coleta, a temperatura (°C), o pH, a condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e o oxigênio dissolvido

(mg/L), por meio de equipamento multiparâmetros da Horiba. Para o solo, em campo, foi mensurada a temperatura (°C), com auxílio de um termômetro Multi Digital, a 15 cm de profundidade, e o pH em H<sub>2</sub>O destilada, utilizando-se o pHmetro pHep<sup>®</sup> 3 da Hanna instrumentos; em laboratório foi mensurada apenas a umidade (%), com o auxílio de um determinador de umidade da Marte ID50. Como a água é um compartimento instável, todas as mensurações foram realizadas em triplicata, e posteriormente calculada a média e o desvio padrão.

#### **4.5. Isolamento e identificação**

As amostras coletadas foram mantidas em laboratório (aprox. 22°C) e as iscas observadas com 7, 14, 21 e 30 dias de incubação a partir da coleta, sob microscópio óptico, para detecção da presença de espécimes de fungos zoospóricos.

Os táxons das amostras foram inicialmente identificados em nível de gênero, quando possível, e isolados em novas iscas e/ou meios de cultura específicos PmTG (0,4 g/L de leite peptonizado, 0,4 g/L de triptona, 2,5 g/L de glicose, 6,5 g/L de ágar e 500 mL de água destilada), mPmTG (0,2 g/L de leite peptonizado, 0,2 g/L de triptona, 1,5 g/L de glicose, 6,5 g/L de ágar e 500 mL de água destilada) (Longcore 1995 modificado) e/ou MP<sub>5</sub> (2 g/L de maltose, 0,5 g/L de peptona, 6,5 g/L de ágar e 500 mL de água destilada) (Beneke & Rogers 1962), com adição de 0,1 g/L sulfato de estreptomicina e 0,1 g/L de penicilina G, para purificação, e posterior identificação morfológica dos espécimes em nível de espécie por meio da utilização dos trabalhos monográficos de Sparrow (1960) e Karling (1977), bem como de descrições originais.

#### **4.6. Análise da comunidade**

Os táxons foram considerados como presentes em cada unidade amostral se presentes durante o período de incubação (7-30 dias). A frequência total de ocorrência (TF) foi baseada na ocorrência de um táxon em cada compartimento/coleta, conforme descrito em Marano *et al.* (2008). Utilizamos a escala Braun-Blanquet (Kershaw 1973; Letcher & Powell 2001) para agrupar as espécies como: onipresentes = ocorrência de 80,1-100%; comuns = 60,1-80% de ocorrência; frequentemente presentes = 40,1-60% de ocorrência; escassas = 20,1-40% de ocorrência ou raras = ocorrência de 0,1 a 20%. A abundância total (AT) dos táxons foi determinada com base no número de ocorrências, considerando a presença ou ausência dos táxons em cada amostra (água, solo, folhas submersas e/ou sedimento de fundo).

A estrutura da comunidade encontrada foi analisada mediante o cálculo de: (i) riqueza de espécies (S); (ii) índice de diversidade de Shannon  $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2(p_i)$ , onde  $p_i$  é a abundância da espécie  $i$ , que contribui para a diversidade total; e (iii) equitabilidade  $E = H'/H'_{\max}$ , onde  $H'_{\max}$  é o máximo valor de diversidade possível para o total de espécies presentes; e (iv) índice de dominância de Simpson  $D = 1/\sum_{i=1}^S (p_i)^2$  (Zak & Willig 2004). Para verificar a existência de diferenças entre as amostras foi aplicado o teste de Wilcoxon, considerando resultados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$  (Hammer *et al.* 2001).

#### **4.7. Obtenção de culturas puras**

Para obtenção de culturas puras, zoósporos dos fungos zoospóricos foram capturados de lâmina escavada contendo a isca colonizada e água destilada esterilizada. Quando observada a liberação de zoósporos, a água foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura, com auxílio de pipeta, semeando-se pela superfície das placas. Posteriormente, as placas foram mantidas em laboratório climatizado (aprox. 22°C) até a germinação dos zoósporos e/ou desenvolvimento do fungo. Repiques foram feitos até a obtenção de cultura pura.

#### **4.8. Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do rDNA**

##### **4.8.1. Produção de biomassa e extração de DNA**

O DNA foi extraído das culturas puras previamente cultivadas em mPmTG e/ou a partir de iscas com o material purificado. Quando de meio de cultura, após crescimento do fungo, fragmentos foram retirados para a incubação em erlenmeyers de 250 mL (duplicata), contendo 30 mL de meio líquido (mPmTG), e incubados em temperatura ambiente por até 20 dias, sem agitação. A biomassa produzida no meio líquido e/ou nas iscas puras foi transferida para microtubo Eppendorf®, onde após ser lavada duas vezes com água destilada esterilizada (1 mL), foi centrifugada a 13000 rpm por sete minutos. Logo em seguida, a água foi descartada e a biomassa utilizada para a extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada com o “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen™). A eficiência da extração foi avaliada através de quantificador de DNA (I Quant). O DNA genômico foi armazenado em freezer (-20) para as etapas posteriores.

#### **4.8.2. Amplificação e purificação do DNA**

Foram amplificadas as regiões LSU, ITS total e SSU do rDNA utilizando os seguintes “primers”: (i) LSU: LR0R/LR5, (ii) SSU: NS4/SR1R (Vilgalys & Hester 1990) e (iii) ITS: ITS4/ITS5 (White *et al.* 1990). As reações de PCR foram realizadas utilizando o “JumpStart RED HT RT-PCR Kit” (Sigma-Aldrich ®) para o volume final de 25 µm em microtubos de 200 mL. Os microtubos foram incubados em termociclador “C1000 Touch™ Thermal Cycler” (Bio-Rad), utilizando o ciclo “Standard PCR” descrito em Marano *et al.* (2014). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados seguindo o protocolo descrito por Schmitz & Riesner (2006), utilizando-se 20 µL de água esterilizada para a suspensão do DNA, e finalmente armazenado em congelador a -20°C.

#### **4.8.3. Sequenciamento**

As amostras amplificadas e purificadas foram sequenciadas em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™) instalado no CEGH-USP, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, USP (<http://genoma.ib.usp.br>) e/ou enviadas para sequenciamento na Macrogen/Korea (<https://dna.macrogen.com>). Para cada reação do sequenciamento foi enviado um microtubo de 200µL contendo 5µL de DNA na concentração de 25-30ng/µL e 2,5 µL de cada primer na concentração de 5µM.

#### **4.8.4. Tratamento das sequências**

As sequências obtidas foram editadas utilizando-se o programa “Sequencher™ Version 4.1.4” para a realização dos cortes de suas extremidades, montagem dos “contigs”, correção de bases ambíguas de acordo com os cromatogramas e obtenção das sequências consenso.

#### **4.9. Análises filogenéticas**

As sequências obtidas foram comparadas com sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank, utilizando-se a ferramenta de busca “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn). A edição foi inicialmente realizada no Bioedit (Hall 1999), onde foram corrigidas as bases ambíguas e as bases faltantes. Os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados utilizando a versão “default” do programa Mafft versão 7 (Katoh *et al.* 2017). O melhor modelo de substituição foi selecionado usando o “Akaike Information Criterion” no programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008).

As sequências, quando necessário, foram concatenadas no SequenceMatrix version 1.8 (Vaidya *et al.* 2010). Os filogramas de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI) foram construídas usando RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) e MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) utilizando-se a plataforma CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>). Realizamos as análises de ML com 1000 réplicas de bootstrap (bs) e o BI usando a metodologia Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para calcular probabilidades posteriores (pp). Os agrupamentos externos para cada análise foram selecionados conforme cada artigo foi redigido, sempre respeitando o histórico evolutivo de cada grupo.

#### **4.10. Análise de ultraestrutura dos zoósporos**

A metodologia utilizada para a análise de ultraestrutura dos zoósporos foi a descrita em Letcher & Powell (2005) adaptada, com auxílio e colaboração do Dr. Gustavo Henrique Jerônimo Alves, bolsista de pós-doutorado da Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli. A metodologia consiste em algumas etapas, as quais são descritas abaixo:

- ✓ Suspensão dos zoósporos: Para cada isolado trinta placas contendo meio de cultura sólido (mPmTG) foram inoculadas com culturas puras e incubadas a 25°C. O tempo de incubação de cada isolado foi determinado baseando-se na velocidade de crescimento das culturas e tempo de maturação dos zoosporângios (entre 3 a 7 dias para os isolados com talo monocêntrico, e entre 30 a 60 dias para os de talo policêntrico). Após o período de incubação e crescimento das culturas, 2 mL de água deionizada ultrapura (Milli-Q®) foram adicionadas às placas, para que as culturas ficassem submersas por aproximadamente 1 hora, ou tempo necessário para que ocorresse a liberação dos zoósporos. Quando observada a liberação dos zoósporos, a água foi removida das placas e acondicionada em tubos Falcon®.
- ✓ Fixação dos zoósporos: em cada tubo Falcon®, com aproximadamente 15 mL da água contendo zoósporos (suspendidos na etapa anterior), foi adicionado volume igual de glutaraldeído 3% (15 mL). Esta solução (água com zoósporos + glutaraldeído) foi inicialmente mantida em repouso, em temperatura ambiente por 2 horas, para a penetração do glutaraldeído nos zoósporos, e posteriormente armazenada em geladeira (4°C) por aproximadamente 12 horas (“overnight”).
- ✓ Lavagem com s-colidina: O material fixado e mantido na geladeira foi centrifugado a 8300 RPM/2400rcf por 30 min para a formação de “pellets” Logo em seguida, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 4 mL da



mistura, quando se deu início ao processo de lavagem e retirada do glutaraldeído, com três lavagens com s-colidina a 0,05M, havendo fase de repouso (20 min) e fase de centrifugação (20 min) de forma intercalada.

- ✓ Osmificação: Após o término das lavagens, o sobrenadante foi descartado e o material fixado com tetróxido de ósmio 1% mantido em repouso por 30 min. Nesta etapa os pellets adquirem uma coloração escurecida (marrom quase preto). Logo após os 30 min, o material foi centrifugado por 20 min (8300 RPM/2400rcf), retirado o sobrenadante, lavado duas vezes com s-colidina 0,05M (novamente esta etapa consiste em fase de repouso (25 min) e centrifugação (20 min), e lavado duas vezes com água deionizada ultrapura (fase de repouso de 15 min e centrifugação de 20 min. Ao término das lavagens com água, os “pellets” foram transferidos para Eppendofs®).
- ✓ Inclusão em ágar nobre: Os “pellets” foram então infundidos em ágar nobre 2%, preparado com água deionizada ultrapura. Nesta etapa é importante que todo o “pellet” esteja infundido no ágar. Após a solidificação do ágar, o bloco de ágar mais pellet foi retirado do Eppendorf® e cortado em pequenos blocos com auxílio de lâmina de bisturi. Os blocos cortados foram lavados com acetona 10% por 10 min (duas vezes) e inseridos em um recipiente contendo acetato de uranila 2%, e mantidos na geladeira (4°C) por 12 horas (overnight).
- ✓ Desidratação: o processo de desidratação do material foi iniciado após a remoção total do acetato de uranila 2%, a qual foi realizada com série gradual de acetona (10, 30, 50, 75, 95, 100%). Em cada etapa o material ficou submerso por 10 min.
- ✓ Infiltração do material em acetona e resina: a resina foi previamente preparada utilizando-se as instruções do kit Araldite-Epon (Embed-812) da EMS (Electron Microscopy Sciences). Nesta etapa o material desidratado foi infiltrado em três etapas com diferentes gradientes de acetona com resina por uma hora: (i) 3 mL de acetona e 1 mL de resina, (ii) 2 mL de acetona para 2 mL de resina e (iii) 1 mL de acetona e 3 mL de resina. Após a etapa de infiltração, o material foi mantido em resina e colocado no vácuo (aprox. 800 mmHg) por 12 horas (overnight) ou por tempo suficiente para que seja retirada toda bolha de ar contida na resina.
- ✓ Preparação dos blocos de resina: o material biológico assim como as legendas que foram adicionadas nos blocos são adicionados aos moldes de silicone específicos para inclusão de materiais, cobrindo-se toda a forma com a resina da etapa

anterior. A forma então foi para estufa por 72 horas a uma temperatura de 65 °C. Os melhores blocos foram selecionados para a secção.

- ✓ Secção dos blocos: Os blocos, após serem seccionados, foram recolhidos em “grids” de níquel e posteriormente corados com citrato de chumbo 2% por 15 min, e lavados com água esterilizada para a remoção do excesso de citrato de chumbo. Os grids ficaram em temperatura ambiente por 20 min até secagem. Esta etapa foi realizada no Núcleo de Microscopia Eletrônica do HCFMUSP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) utilizando-se o ultramicrotomo Reichert Ultracut UCT.
- ✓ Fotografias por microscopia eletrônica de transmissão: Assim como as secções, as fotografias foram realizadas no Núcleo de Microscopia Eletrônica do HCFMUSP, utilizando-se o microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010. Todas as secções foram observadas para obtenção das melhores imagens.

#### **4.11. Teste de crescimento**

Com o intuito de testar a tolerância de temperatura dos fungos zoospórios, pouco relatado em literatura, assim como testar os diferentes meios de cultura utilizados para isolamento e manutenção, culturas de fungos zoospórios com crescimento policêntrico, obtidas neste estudo, foram submetidas a teste de crescimento com quatro diferentes meios de cultura: PmTG (0,4 g/L de leite peptonizado, 0,4 g/L de triptona, 2,5 g/L de glicose e 12 g/L de ágar), mPmTG (0,2 g/L de leite peptonizado, 0,2 g/L de triptona, 1,5 g/L de glicose e 12 g/L de ágar), CMA+G (17 g/L de “corn meal agar”, 2,5 g/L de glicose) e YPSS/4 (5 g/L de amido solúvel, 0,250g/L de extrato de levedura, 0,250 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.125 g/L MgSO<sub>4</sub>, 12 g/L de ágar), utilizando intervalo de temperatura de 10 a 45 graus.

Inicialmente, os isolados foram cultivados em PmTG e incubados a 21°C por 21 dias. Discos contendo parte do talo dos fungos foram cortados com auxílio de um furador (6 mm diâm.) e incubados a 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C. Três réplicas de cada meio de cultura foram preparadas e incubadas no escuro por duas semanas (14 dias), ou até que atingissem crescimento total na placa. Após este período, foram mensurados os diâmetros das colônias em 4 direções opostas, com auxílio de uma régua milimétrica.

## **4.12. Preservação**

### **4.12.1. Culturas e lâminas semipermanentes**

As culturas obtidas foram depositadas na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica – CCIBt, por meio de tubos de ensaio com meio de cultura inclinado, e cultura em meio líquido armazenados em geladeira a aproximadamente 4°C.

Para os táxons identificados, e que não foi possível a obtenção de cultura pura, lâminas semipermanentes foram preparadas com azul de algodão e lactofenol e incorporadas no Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP) do Instituto de Botânica.

### **4.12.2. Criopreservação dos isolados**

Os isolados cultivados, inicialmente em meio de cultura sólido, foram transferidos para meio líquido (PmTG) em tubos Falcon® (30 mL) e incubados por aproximadamente três semanas. Após este período, os tubos foram centrifugados e parte do sobrenadante removida, restando assim apenas 10 mL do meio líquido inicial e biomassa produzida. A esta biomassa foi adicionada 1 mL de dimetilsulfato (10%DMSO) e 1 mL de soro fetal bovino (10%), cuja mistura ficou em repouso por 30 min. Após este período, 1 mL de cada mistura foi pipetada para criotubos de 1,5 mL, e acondicionadas em caixas de polipropileno (Criobox). Em um recipiente foi adicionado isopropanol, dentro do qual foram colocadas as caixas de polipropileno, que foi estocado em freezer a -20°C. As caixas foram mantidas no isopropanol por 48 horas; após este período o isopropanol foi removido e as caixas de polipropileno mantidas no freezer a -20°C, segundo metodologia de Boyle *et al.* (2003) adaptada. Para reativação das culturas dos fungos, os criotubos mantidos a -20°C foram removidos do freezer e submergidos em banho maria à 43°C por aproximadamente 1 minuto, acelerando assim o processo de degelo das amostras, onde as culturas foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido (mPmTG) e incubadas a 22°C.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Caracterização dos fatores abióticos nos locais de coleta**

Durante a amostragem, a temperatura da água variou conforme as estações do ano, com a mínima de 15,6°C em agosto/2016 e máxima de 25,6°C em fevereiro/2017. O pH se manteve entre 4 e 7, durante todo o período de estudo. Valores baixos e constantes foram obtidos para a condutividade elétrica (0,03-0,30  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). O oxigênio dissolvido

também pouco variou, evidenciando boa oxigenação da água da maioria dos locais amostrados (6,00-8,81 mg.L<sup>-1</sup>), com exceção dos locais onde a água era mais escura e com grande quantidade de material em decomposição e substâncias húmicas do solo (3,30 mg.L<sup>-1</sup>). Para o solo, a temperatura observada no período de estudo variou entre 15,63-26,40°C, com a mínima em agosto/2016. O pH se mostrou ácido em todas as amostras (4,26-6,93), com solos mais secos coletados em restinga (3,7%) e mais úmidos em banhado (92%) (Anexo I).

## 5.2. Isolamento e identificação dos fungos zoospóricos

De 185 amostras coletadas (45 amostras de água, 45 de sedimento de fundo, 45 de folhas submersas 45 de solo e 5 de frutos submersos -maçã), um total de aproximadamente 2.160 iscas padronizadas, além de iscas não padronizadas (fios de cabelo e semente de *Sorghum* sp.), foram analisadas, com 435 espécimes isolados. Com base nos estudos morfológicos e/ou moleculares realizados, 47 espécies foram identificadas (02 Blastocladiomycota, 02 Monoblepharidomycota e 43 Chytridiomycota), sendo um novo gênero, *Karlingiella*, gênero criado para acomodar a espécie *Nowakowskiella elongata* Karling, publicado em colaboração na revista *Mycologia* 111(3):506-516 (2019); três novas espécies, *Kappamyces microporosum*, *Siphonaria aurea* e *Rhizidium crepaturum*; duas possíveis novas espécies, *Entophlyctis* sp. 1 e *Rhizophlyctis* sp. 1; e cinco primeiras citações para o Brasil, *Angulomyces argentinensis*, *Karlingiomyces marylandicus*, *Podochytrium chitinophilum*, *Rodmanochytrium sphaericum* e *Rhizoclostridium globosum*. *Angulomyces*, *Rodmanochytrium* e *Rhizoclostridium* são gêneros relatados pela primeira vez no país. Todos os táxons foram inicialmente purificados nas mesmas iscas de onde foram isolados, o que facilitou a identificação morfológica prévia dos gêneros e espécies, bem como a obtenção de DNA genômico, tanto dos que cresceram em meio de cultura (30 espécimes), como de alguns dos quais foram realizadas extrações diretamente das iscas (3 espécies).

A diversidade, a frequência de ocorrência e a abundância de todos os táxons identificados são apresentadas no capítulo I e, descrições, comentários e ilustrações dos novos táxons nos capítulos II e III desta tese.

### 5.3. Análises filogenéticas

#### 5.3.1. Sequências de bases nucleotídicas

Foram obtidas 85 sequências de bases nucleotídicas (Tabela 1) das regiões SSU, ITS total e LSU do rDNA dos espécimes estudados, as quais foram comparadas com sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando-se a ferramenta de busca “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn). As sequências obtidas estão sendo depositadas no GenBank, na medida que os artigos são redigidos e submetidos à publicação.

**Tabela 1.** Táxons, isolados, e código de acesso ao GenBank

Táxons	Isolados	Código de acesso GenBank		
		SSU	ITS	LSU
<i>Allomyces arbusculus</i>	CCIBt4411	MT409101	MT412115	MT418676
<i>Angulomyces argentinensis</i>	SP512583	MN511693	MN509013	MN508392
<i>Boothiomyces elyense</i>	CCIBt4547	MN511695	MN509015	MN508394
<i>Boothiomyces sp.</i>	CCIBt4414	MN511694	MN509014	MN508393
<i>Chytrium hyalinus</i>	SP512550	MT406240	MT410712	MT406231
<i>Chytrium hyalinus</i>	CCIBt4410	MT406241	MT410713	MT406232
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4390	MH590086	MH590048	MH590073
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4427	MT409105	MT412118	MT418679
<i>Cladochytrium sp.</i>	CCIBt4391	X	X	X
<i>Cladochytrium sp.</i>	CCIBt4686	X	X	X
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4389	MT406242	MT410714	NA
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4412	MT406243	MT410715	MT406233
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4392	MT406244	MT410716	NA
<i>Endochytrium operculatum</i>	SP512566	X	X	NA
<i>Kappamyces microporosus</i>	CCIBt4548	MN511698	NA	MN508397
<i>Karlingiella elongata</i>	CCIBt4416	X	NA	NA
<i>Karlingiella elongata</i>	SP512555	NA	MH590050	MH590075
<i>Monoblepharella sp.</i>	CCIBt4395	MT409102	MT4012116	MT418677
<i>Nowakowskiella elegans</i>	CCIBt4426	MH590091	MH590053	MH590079
<i>Polychytrium aggregatum</i>	SP512565	MH590095	MH590057	MH590083
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt4393	MT409103	X	X
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt4394	MT409104	MT412117	MT418678
<i>Rodmanochytrium sphaericum</i>	CCIBt4546	MT406245	MT410717	MT406235
<i>Rhizidium crepaturum</i>	SP512582	MT406246	MT410718	MT406236
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	CCIBt4413	MN511696	MN509016	MN508395
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	CCIBt4415	MN511697	MN509017	MN508396
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	ALJ 1	MT409097	MT412112	MT418672

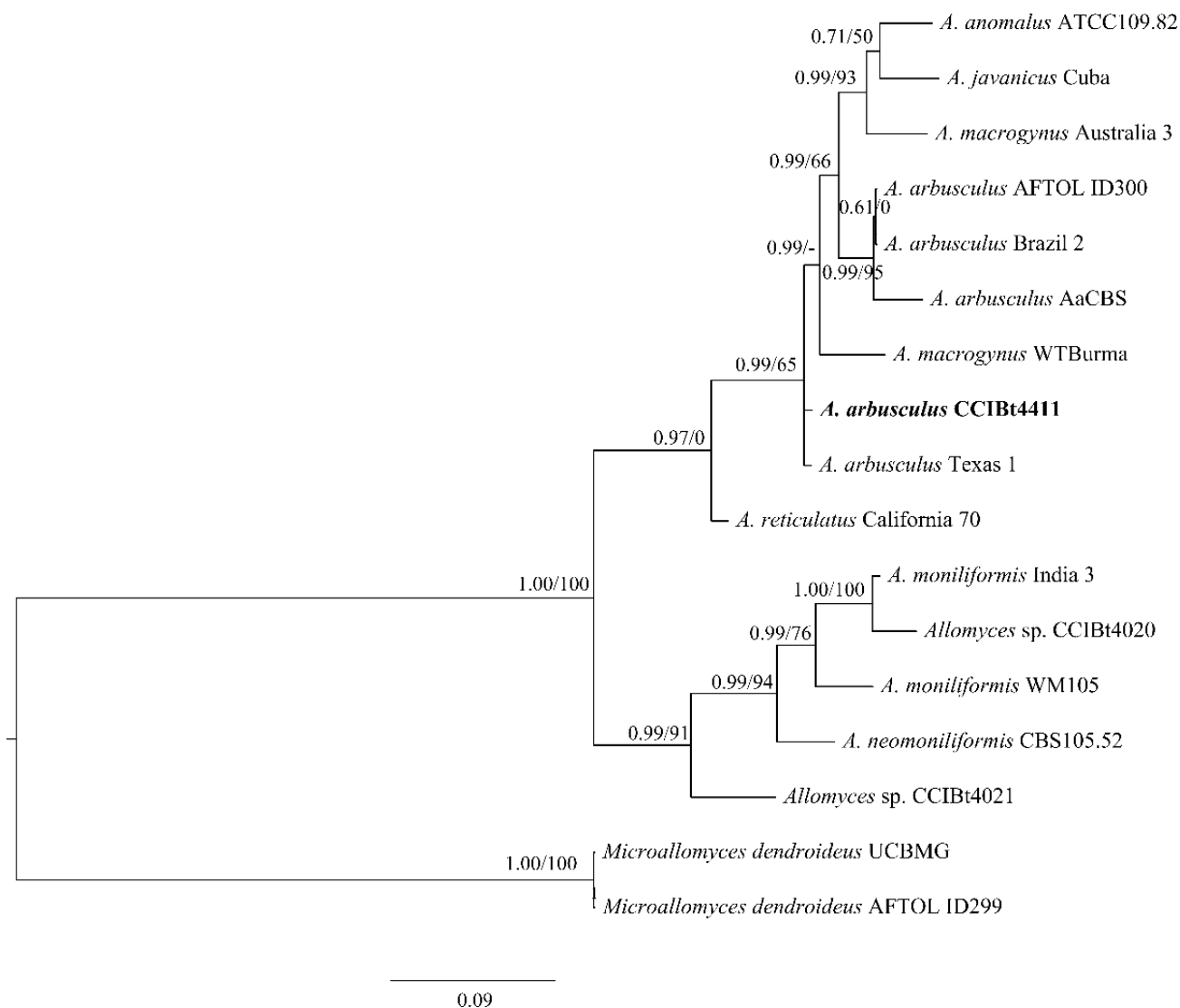
Táxons	Isolados	Código de acesso GenBank		
		SSU	ITS	LSU
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	ALJ 27	MT409098	MT412113	MT418673
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	ALJ 29	MT409099	MT412114	MT418674
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	ALJ 40	MT409100	NA	MT418675
<i>Siphonaria aurea</i>	CCIBt4685	MT406247	MT410719	MT406237

X=regiões sequenciadas sem código do GenBank. NA=região não sequenciada.

### 5.3.2. Análises filogenéticas de espécimes que não foram incluídos nos capítulos apresentados nesta tese

#### 5.3.2.1. BLASTOCLADIOMYCOTA

Duas espécies pertencentes a ordem Blastocladales foram identificadas neste estudo: *Allomyces arbusculus* e *Catenophlyctis variabilis*. Não foi possível obter cultura pura ou isolamento em isca pura de *Catenophlyctis variabilis*, sendo sua identificação realizada por meio das mensurações das estruturas morfológicas em ecdise de cobra. *Allomyces arbusculus*, isolado identificado e posicionado em análises concatenadas das três regiões sequenciadas neste estudo (figura 7), encontra-se juntamente com outros isolados de *A. arbusculus*, *A. anomalus*, *A. javanicus* e *A. macrogynus*. Com exceção de *A. anomalus*, todas as outras espécies possuem em comum o ciclo de vida com alternância de geração, apresentando fase esporofítica e gametofítica. A filogenia de *Allomyces* aponta para uma polifilia do gênero, o qual necessita de revisão morfológica para delimitação das espécies. Potter *et al.* (2011) já citaram esta polifilia, a qual pode ser explicada por uma identificação errônea dos isolados depositados no GenBank. Nosso isolado CCIBt4411 foi identificado em nível específico como *A. arbusculus*, tendo como base suas características morfológicas, as quais são semelhantes ao espécime tipo, descrito por Butler (1911).

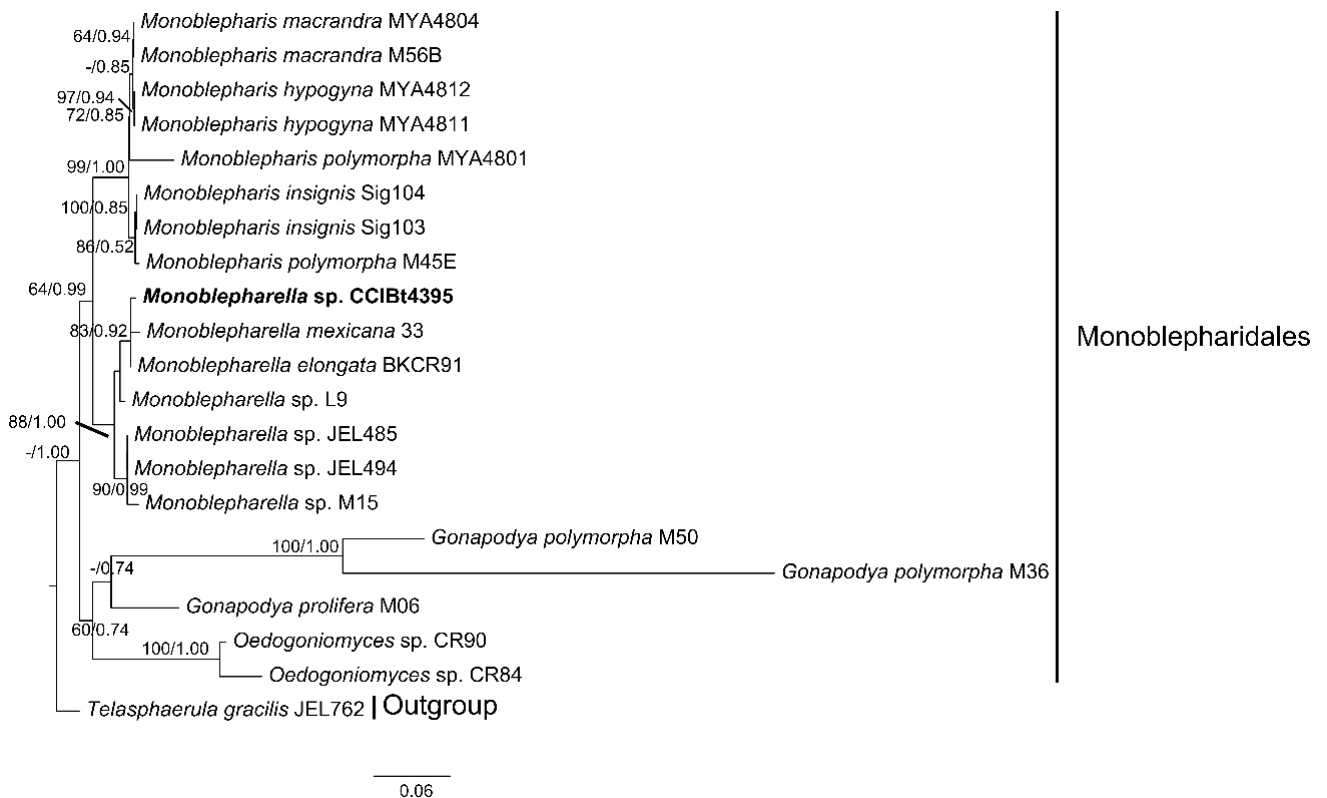


**Figura 7.** Filograma gerado de análise concatenada (SSU, ITS e LSU) de inferência Bayesiana com isolados do gênero *Allomyces*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de probabilidade posterior e bootstrap (%). Apenas os valores superiores a 50% foram indicados numericamente. A ausência de ramificação na análise de máximo verossimilhança é indicada com (0). A barra indica valores de substituição por sitio. Isolado deste estudo é indicado em negrito.

### 5.3.2.2. MONOBLEPHARIDOMYCOTA

Duas espécies pertencentes a ordem Monoblepharidales foram identificadas, *Gonapodya* sp. e *Monoblepharella* sp. Nenhuma das duas espécies apresentaram estruturas morfológicas suficientes para a identificação em nível de espécie. *Gonapodya* sp. foi observada apenas na isca original (maçã), não se desenvolvendo em outras iscas, e também não sendo possível seu isolamento em meio de cultura. *Monoblepharella* sp. (CCIBt4395), isolada a partir do crescimento em ecdise de cobra em cultura pura, não obteve desenvolvimento completo após seu isolamento, mesmo com todos os esforços

realizados para que produzisse estruturas de reprodução sexuada. Sem a observação completa do desenvolvimento e ciclo de vida do isolado, não foi possível a identificação em nível de espécie. Análises filogenéticas de dados concatenados das regiões SSU, ITS e LSU do rDNA (Figura 8) posiciona o isolado CCIBt4395 juntamente com *Monoblepharella elongata* e *Monoblepharella mexicana* com alto suporte (88% bp e 1.00 pp); no entanto, como não há sequências disponíveis das cinco espécies descritas, as análises também não colaboraram para a identificação do isolado em nível molecular.



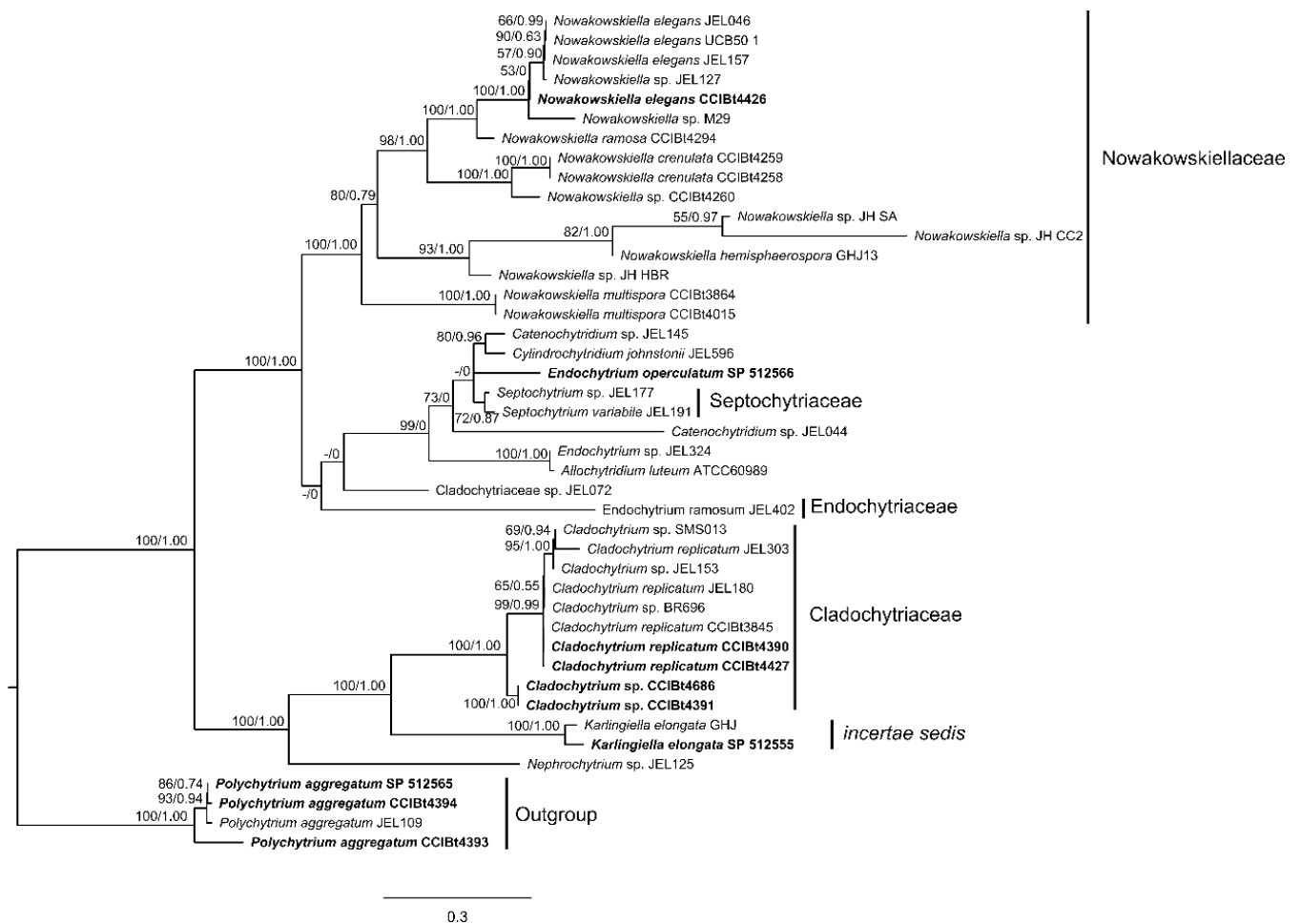
**Figura 8.** Filograma gerado de análise concatenada (SSU, ITS e LSU) de máxima verossimilhança com isolados da ordem Monoblepharidales. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) e probabilidade posterior. Apenas os valores superiores a 50% foram indicados numericamente. A barra apresenta valores de substituição por sítio. Isolado deste estudo é indicado em negrito.

### 5.3.2.3. CHYTRIDIOMYCOTA

Quarenta e três espécies de Chytridiomycota, pertencentes as ordens Chytridiales (18), Cladochytriales (16), Polychytriales (1), Rhizophydiales (5) e Rhizophlyctidales (3), foram identificadas. Alguns isolados de Cladochytriales deste estudo já foram publicados em colaboração em Jerônimo *et al.* (2019a), como a criação do novo gênero *Karlingiella*, para acomodar a espécie *Karlingiella elongata* (Anexo II), sendo na oportunidade



também utilizados na filogenia os isolados de *Cladochytrium replicatum*, *Nowakowskiella elegans* e *Polychytrium aggregatum* obtidos neste estudo. Na oportunidade, *Karlingiella* foi posicionada na família Cladochytriaceae, agrupamento irmão de *Cladochytrium replicatum*. O espécime de *Karlingiella elongata* encontra-se em estudo, visando determinar a ultraestrutura dos seus zoósporos (item 5.4), no entanto, até o término da redação desta tese, não foi possível a conclusão das análises, porém podemos afirmar que *Karlingiella elongata* não pertence a família Cladochytriaceae (Figura 9).



**Figura 9.** Filograma gerado de análise concatenada (SSU, 5,8S e LSU) de máximo verossimilhança com isolados da ordem Cladochytriales. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) e probabilidade posterior. Apenas os valores superiores a 50% foram indicados numericamente. A barra indica valores de substituição por sitio. Isolados deste estudo são indicados em negrito.

*Endochoytrium operculatum* SP512566, identificado e sequenciado por meio da purificação das iscas, também possui posicionamento filogenético incerto dentro da

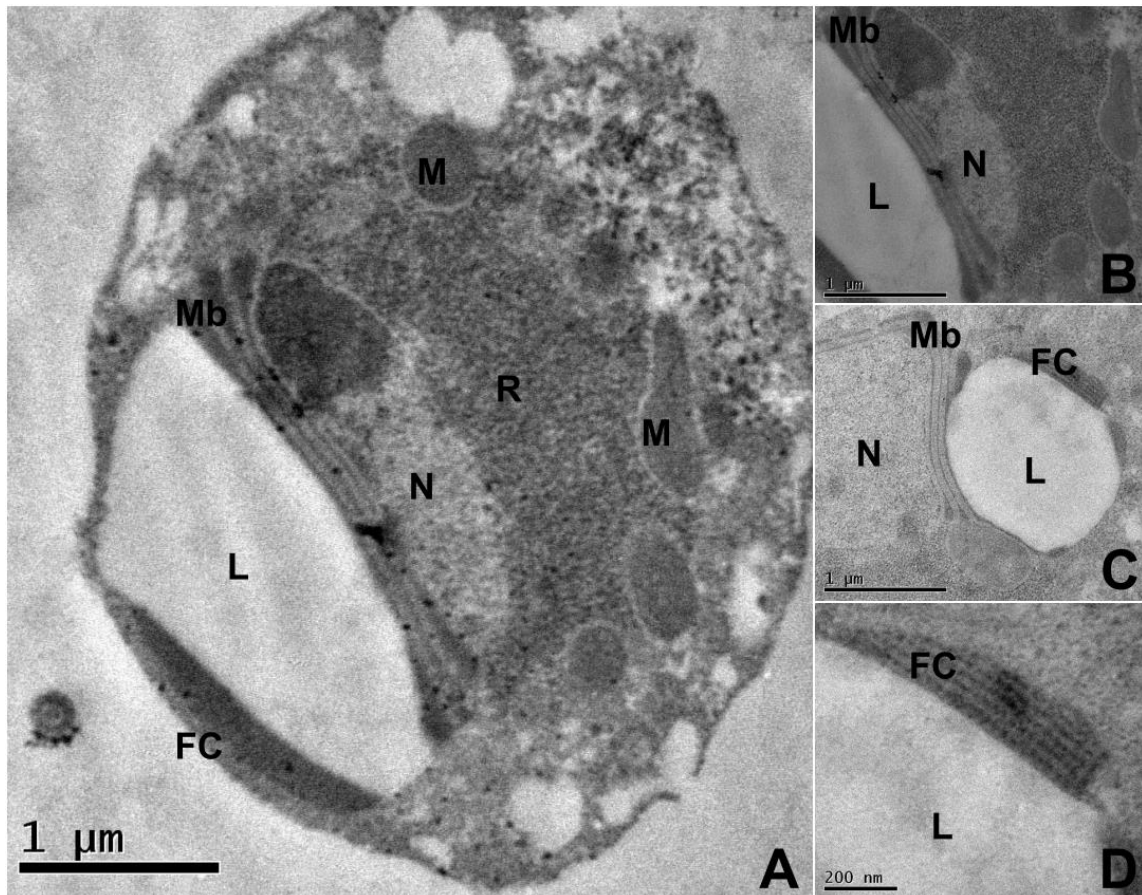
ordem Cladochytriales. Mozley-Standridge *et al.* (2009), quando propuseram a classificação da ordem Cladochytriales, comentam a polifilia de alguns gêneros, dentre eles, *Endochytrium*, o qual se agrupa em vários clados distantes da espécie tipo *Endochytrium ramosum*, família Endochytriaceae. O isolado SP512566 se posiciona juntamente aos isolados *Catenochytridium* sp. JEL145 e *Cylindrochytridium johnstonii* JEL596, os quais também apresentam posicionamento incerto na filogenia de Cladochytriales. A polifilia destes gêneros pode ser reflexo da baixa amostragem, pois há poucas sequências disponíveis em bancos de dados, e/ou identificações errôneas, com base em poucas características que não definem bem as espécies (Mozley-Standridge *et al.* 2009).

Outra espécie desta ordem, *Cladochytrium* sp. (CCIBt4391 e 4686), é uma possível espécie nova para o gênero *Cladochytrium*. Esta espécie é similar a *C. replicatum*, no entanto, demonstrou ser diferente nas análises filogenéticas apresentadas (Figura 9), o que demandará futuras pesquisas para sua determinação.

#### **5.4. Análises de ultraestrutura dos zoósporos**

Cinco espécies consideradas como novos táxons e/ou de posicionamento incerto nas filogenias apresentadas neste estudo (*Cladochytrium* sp., *Cladochytrium tenue*, *Karlingiella elongata*, *Rodmanochytrium sphaericum* e *Siphonaria aurea*), foram preparadas para análise de ultraestrutura dos seus zoósporos. *Siphonaria aurea* é novo táxon da ordem Chytridiales (Chytridiomycota), sendo apresentados no Capítulo III desta tese.

*Karlingiella elongata*, espécie e gênero descritos recentemente, possui posicionamento incerto dentro da ordem Cladochytriales (Figura 9). Após análise de algumas imagens de ultraestrutura dos zoósporos, a criação de uma nova família para posicionamento da espécie se faz necessária. O isolado de *Karlingiella elongata* estudado apresentou características únicas dentro da ordem Cladochytriales, como microcorpos recobrando parcialmente o glóbulo lipídico em três camadas (Figura 10B) e também se estendendo em uma grande porção do núcleo (Figura 10C), o qual está totalmente inserido na agregação dos ribossomos (Figura 10A). Além da característica dos microcorpos, a cisterna fenestrada apresenta feixes horizontais (Figura 10D), a qual foi observada pela primeira vez no grupo. Como não foi possível obter imagens de todas as estruturas necessárias para a publicação até o término desta tese, esses resultados continuarão a ser explorados e novas imagens serão realizadas em projeto futuro.



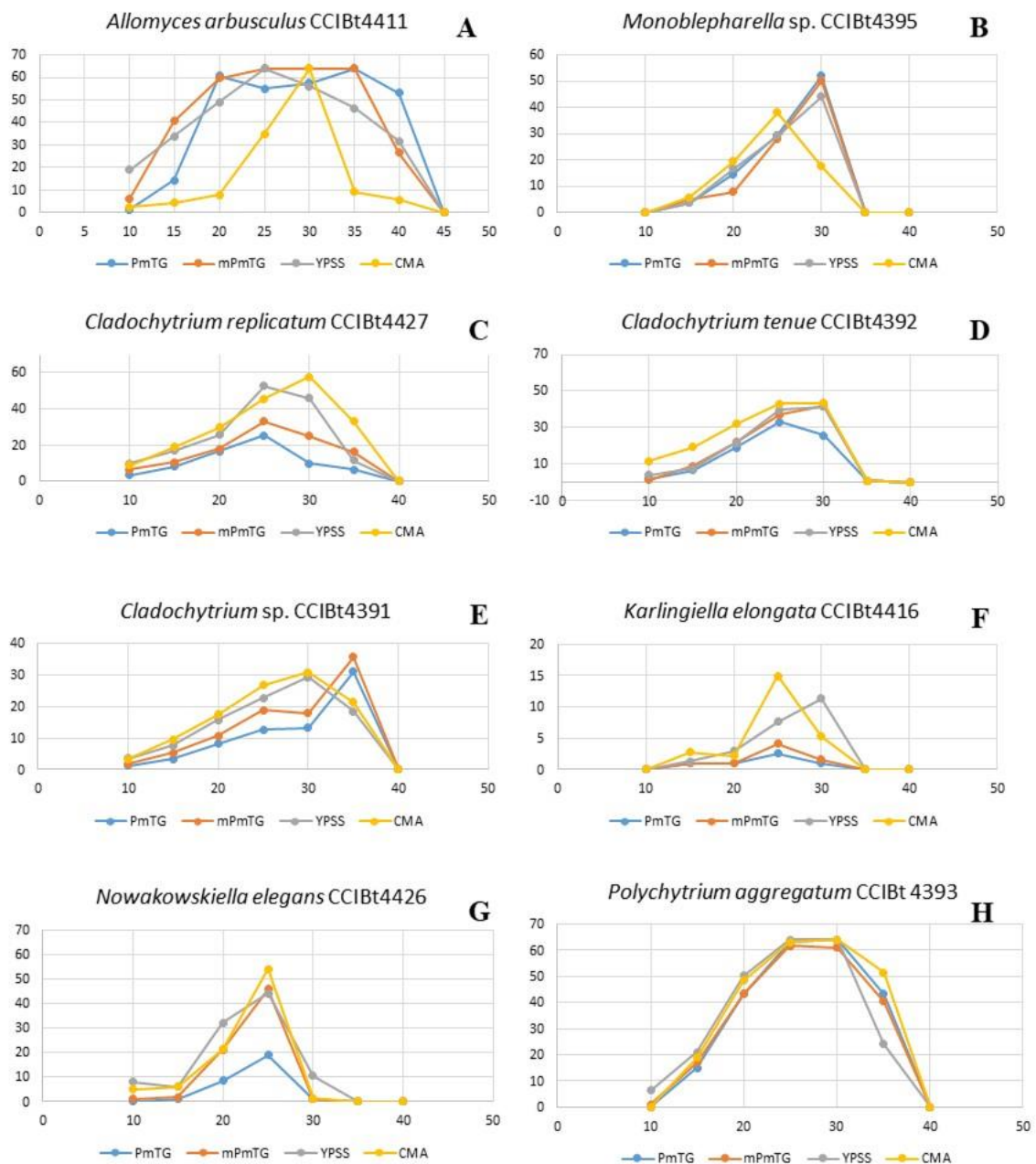
**Figura 10A-D.** Ultraestrutura dos zoósporos de *Karlingiella elongata*. A. Secção transversal mostrando agregação dos ribossomos, mitocôndria, núcleo, glóbulo lipídico, cisterna fenestrada e microcorpos. B. Secção transversal mostrando os microcorpos. C. Secção transversal mostrando os microcorpos ao redor do glóbulo lipídico e se estendendo sob o núcleo. D. Secção transversal mostrando a cisterna fenestrada. FC: Cisterna fenestrada. Mb: Microcorpos. L: Glóbulo lipídico. M: mitocôndrias. N: núcleo. R: agregação dos ribossomos.

As espécies *Cladochytrium tenue* e *Cladochytrium* sp., também possuem posições incertas, necessitando de análises de ultraestrutura dos zoósporos para definição de posicionamento, as quais serão realizadas posteriormente.

### 5.5. Teste de Crescimento

Para os testes de crescimento em diversas temperaturas, oito espécies foram selecionadas: *Allomyces arbusculus*, representante micelial de Blastocladiomycota; *Monoblepharella* sp., representante pseudo-micelial de Monoblepharidomycota; e representantes com talo policêntrico de Chytridiomycota, *Cladochytrium replicatum*, *C. tenue*, *Cladochytrium* sp., *Karlingiella elongata*, *Nowakowskiella elegans* e *Polychytrium*

*aggregatum*. O diâmetro das culturas cultivadas nas diferentes temperaturas e meios de cultura foram plotados em gráficos (Figura 11).



**Figura 11.** Gráficos apresentando resultados do teste de crescimento em diferentes temperaturas e meios de cultura para as espécies testadas. Eixo X. Temperatura em °C. Eixo Y. Crescimento em mm.

O isolado de *Allomyces arbusculus* apresentou um ótimo crescimento em três dos quatro meios testados (Figura 11A). A temperatura ótima de crescimento foi entre 25 a 35°C, atingindo o total da área de crescimento (borda da placa) antes do período testado (11 dias). *Monoblepharella* sp. apresentou melhor crescimento em PmTG e mPmTG

(Figura 11B), sendo a temperatura ótima a de 30°C; o crescimento em CMA foi melhor em temperaturas mais baixas. *Cladochytrium replicatum* e *C. tenue* apresentaram crescimento semelhante em todos os meios de cultura testados, obtendo maior colônia em CMA e YpSs (Figura 11C-D), com temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30°C. *Cladochytrium* sp. obteve crescimento menor que as outras espécies de *Cladochytrium* testadas, apresentando melhor crescimento em YpSs e CMA nas temperaturas de 10 a 30°C e PmTG e mPmTG em 35°C (Figura 11E). *Karlingiella elongata* apresentou melhor crescimento em YpSs e CMA (Figura 11F), com temperatura ótima em 25°C. *Nowakowskiella elegans*, somente não apresentou bom crescimento em PmTG (Figura 11G), sendo a temperatura ótima a de 25°C. *Polychytrium aggregatum* apresentou crescimento semelhante em todos os meios de cultura testados, sendo a temperatura ótima entre 25 e 30°C (Figura 11H).

De forma geral, a maioria das espécies testadas apresentou melhor crescimento nos meios YpSs e CMA; no entanto, esses meios não demonstraram ser bons para a manutenção das culturas. Como os isolados tem um rápido crescimento nestes meios, as colônias formaram poucas estruturas de resistência e rizomicélio mais fino, tornando a cultura fraca e não voltando a se desenvolver posteriormente no mesmo meio ou em outros meios de cultura. Nenhuma das temperaturas testadas foram temperaturas de morte para as espécies testadas. Mesmo não obtendo crescimento em determinada temperatura, o isolado voltou a crescer quando incubados novamente a 25°C, temperatura considerada normalmente boa para a maioria dos isolados. Estudos com outros organismos do reino dos fungos demonstraram que os fungos são altamente tolerantes a altas temperaturas, crescendo bem entre 5 e 35°C (Emerson 1968, Gleason 1971); no entanto, não se sabe muito sobre a tolerância de temperatura dos fungos zoospóricos devido à escassez de estudos com o grupo, pela dificuldade de isolamento, identificação e preservação da maioria das espécies.

## **5.6. Preservação dos espécimes obtidos**

Espécimes representativos de cada táxon foram depositados no Herbário SP por meio de lâminas semipermanentes e/ou aqueles isolados em cultura pura, incorporados na CCIBt (Tabela 2). No total, foram isolados 30 espécimes de 19 espécies, no entanto, apenas 14 espécies foram incluídas na coleção (CCIBt) devido a morte das culturas.

**Tabela 2.** Táxons depositados no Herbário SP e/ou incorporados na Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt).

Táxons	CCIBt/ Herbário SP
<i>Allomyces arbusculus</i>	CCIBt4411/ SP512572
<i>Angulomyces argentinensis</i>	SP512583
<i>Asterophlyctis sacoptoides</i>	SP512562
<i>Boothiomyces elyense</i>	CCIBt4547
<i>Boothimoyces</i> sp.	CCIBt4414
<i>Chytriomycetes appendiculatus</i>	SP512557
<i>Chytriomycetes hyalinus</i>	CCIBt4410/ SP512558
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4390/4427
<i>Cladochytrium setigerum</i>	s/n
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4389/4392/4412
<i>Cladochytrium</i> sp.	CCIBT4391/4686
<i>Catenochytridium kevorkianii</i>	SP512567
<i>Catenophlyctis variabilis</i>	SP512574
<i>Diplophlyctis asteroidea</i>	SP512561
<i>Diplophlyctis intestina</i>	SP512560
<i>Entophlyctis luteolus</i>	SP512571
<i>Entophlyctis texana</i>	SP512577
<i>Entophlyctis</i> sp.1	SP512573
<i>Endochytrium operculatum</i>	SP512566
<i>Fayochytriomycetes spinosus</i>	SP512559
<i>Globomyces pollinis-pini</i>	s/n
<i>Gonapodya</i> sp.	SP512568
<i>Karlingiomyces dubius</i>	SP512556
<i>Karlingiomyces granulatus</i>	SP512554
<i>Karlingiomyces marilandicus</i>	SP512579
<i>Kappamyces microporosus</i> sp. nov.	CCIBt4548
<i>Karlingiella elongata</i>	CCIBt4416/ SP512555

Táxons	CCIBt/ Herbário SP
<i>Monoblepharella</i> sp.	CCIBt4395
<i>Nowakowskiella elegans</i>	CCIBt4426
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i>	SP512552
<i>Nowakowskiella multispora</i>	SP512551
<i>Nowakowskiella ramosa</i>	SP512550
<i>Nowakowskiella</i> sp.1	SP512578
<i>Phlyctochytrium aureliae</i>	s/n
<i>Phlyctochytrium reinboldtiae</i>	s/n
<i>Podochytrium chitinophilum</i>	SP512580
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt4393/4394/ SP 512565
<i>Rodmanochytrium sphaericum</i>	CCIBt4546
<i>Rhizidium crepaturum</i> sp. nov.	SP512582
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	SP 512569
<i>Rhizophlyctis hyalina</i>	SP 512553
<i>Rhizophlyctis</i> sp. 1	SP 512570
<i>Rhizoclostridium globosum</i>	CCIBt4413/4415
<i>Septochytrium variabile</i>	s/n
<i>Septochytrium willoughbyi</i>	SP 512563
<i>Septosperma rhizophydii</i>	SP 512564
<i>Siphonaria aurea</i> sp. nov.	CCIBt4685/SP512581

Alguns táxons foram cultivados em cultura pura (*Allomyces arbusculus*, *Boothomyces elyense*, *Boothomyces* sp., *Chytromyces hyalinus*, *Rodmanochytrium sphaericum*, *Cladochytrium replicatum* (02 isolados), *C. tenue* (03 isolados), *Cladochytrium* sp. (02 isolados). *Kappamyces microporosum*, *Rhizoclostridium globosum* (02 isolados), *Karlingiella elongata*, *Monoblepharella* sp. e *Nowakowskiella elegans* foram submetidos à técnica de criopreservação descrita por Boyle *et al.* (2003, adaptado). A técnica se mostrou eficaz para os isolados com talo monocêntrico (*Boothomyces elyense*, *Boothomyces* sp., *Chytromyces hyalinus*, *Kappamyces*

*microporosum*, *Rhizoclosmatium globosum* e *Rodmanochytrium sphaericum*), além de para um isolado micelial de Blastocladiomycota (*Allomyces arbusculus*), os quais estão sendo mantidos em freezer a -20°C. Segundo Gleason *et al.* (2007), o alto sucesso da criopreservação, especialmente das quitrídias monocêntricas, se deve a preservação de culturas jovens (com até 7 dias de crescimento); no entanto, para as espécies com talo policêntrico, o tempo não é suficiente para que o rizomicélio produza estruturas resistentes ao DMSO, causando um colapso no talo e a preservação ineficiente destes organismos. Nesta tese, testamos também as culturas policêntricas com 15 e 30 dias, mas não obtivemos sucesso na criopreservação dos isolados.

### **5.7. Capítulos apresentados nesta tese**

Diante dos resultados apresentados acima, três capítulos foram elaborados, tendo sido o segundo capítulo já submetido para publicação na revista *Nova Hedwigia*. Demais capítulos se encontram no formato da revista a serem submetidos.

**Capítulo I.** Diversity of Blastocladiomycota, Chytridiomycota and Monoblepharidomycota of the “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, São Paulo State, Brazil

**Capítulo II.** Chytridiales and Rhizophydiales (Chytridiomycota): new species and new records for Brazil

**Capítulo III.** New genus and three new species to the Chytriomycetaceae (Chytridiales, Chytridiomycota): morphological, phylogenetical and ultrastructural characterization



# **CAPÍTULO I**

(Artigo a ser submetido à revista Sydowia)

# **Diversity of Blastocladiomycota, Chytridiomycota and Monoblepharidomycota from Atlantic Rainforest area, São Paulo State, Brazil**

Ana Lucia de Jesus\* & Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli

Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, São Paulo, SP CEP  
04301-912, Brazil

\*e-mail: analuciajesus@hotmail.com

## Abstract

Members of Blastocladiomycota, Chytridiomycota, and Monoblepharidomycota can be either saprobes or parasites in aquatic and terrestrial ecosystems. Most species are decomposers of the cellulosic, chitinous and keratinous substrates, however some of them are important parasites of algae, plants, fungi, and invertebrate and vertebrate animals. These fungi have as a common feature the presence of a spore with a single posteriorly inserted whiplash flagellum (zoospore). Although they require water to complete their life cycle, they often survive adverse conditions for long periods by the production of resistance structures. In this study, samples of soil, water, submerged leaves, and surface sediments were collected from freshwater bodies at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”. Forty-six taxa belonging to Chytridiomycota (42), Blastocladiomycota (2), and Monoblepharidomycota (2) were recovered and identified using the multiple baiting technique. *Chytriomycetes appendiculatus* Karling and *Cladochytrium replicatum* Karling were ubiquitous, whereas most species were scarce to rare, according to their frequency in the collected samples. This study contributes to the knowledge of the diversity, occurrence, and abundance of zoosporic fungi at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, an important preserved Atlantic Rainforest area, never before studied.

Keywords: ecology, morphology, saprobes, zoosporic fungi

## Introduction

The phylum Chytridiomycota as defined by Barr (1990), is currently divided into six phyla, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota and Rozellomycota (James et al. 2006; Powell & Letcher 2014; Tedersoo et al. 2018). Excluding some members of Neocallimastigomycota that also have multiflagellate zoospores (James et al. 2006), they all reproduce asexually by zoospores with a single posteriorly inserted whiplash flagellum. They require water to complete their life cycle, but they often survive for long periods under adverse conditions by the production of resistance structures.

These fungi are commonly found in aquatic and terrestrial ecosystems as saprobes, growing endo or epibiotically on cellulosic, chitinous and keratinous substrates. Some of them are also important parasites of algae, plants, fungi, and invertebrate and vertebrate animals (Longcore et al. 1999; Barr 2001; James et al. 2006; Shearer et al. 2007). Their thalli can be monocentric, polycentric or filamentous, showing huge morphological plasticity.

Blastocladiomycota, which was the first phylum segregated from Chytridiomycota, contains zoosporic fungi with a prominent nuclear cap in the zoospores (James et al. 2006). This phylum was traditionally considered closely related to Chytridiomycota; however, recent molecular phylogenies have shown a large phylogenetic distance between blastoclads and chytrids (Hibbett et al. 2007; James et al., 2014; Tedersoo et al. 2018). On the other hand, the Monoblepharidomycota, which was elevated to the level of phylum by Doweld (2001), has been undergoing many changes in its placement in the fungal phylogeny in the last few years (James et al. 2006; Hibbett et al. 2007; Powell & Letcher 2014; Tedersoo et al. 2018). Although some authors (Dee et al. 2015; Karpov et al. 2017) still considered it a sister Class to Chytridiomycetes, herein

we consider it to be a phylum, as recognised by Powell & Letcher (2014). They bear many similarities with members of the Chytridiomycota, but they are distinguished from other zoosporic fungi mainly by their typical oogamous sexual reproduction (Powell & Letcher 2014; Dee et al. 2015).

Species of Blastocladiomycota and Chytridiomycota are mainly represented in Atlantic Rainforest areas of Brazil (Pires-Zottarelli et al. 1996; Rocha & Pires-Zottarelli 2002; Pires-Zottarelli & Gomes 2007; Pires-Zottarelli & Rocha 2007; Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, 2012; Jesus et al. 2013; Jerônimo et al. 2015, 2019a, b), with few species of Monoblepharidomycota, Olpidiomycota and Rozellomycota (Milanez et al. 2007). Of the approximately 1.200 described species, only 134 (Chytridiomycota: 101, Blastocladiomycota: 17, Olpidiomycota: 7, Rozellomycota: 5, and Monoblepharidomycota: 4) were cited for this country (Maia et al. 2015; Jerônimo et al. 2019a, b). The aim of this study was to assess the species composition and community structure of Blastocladiomycota, Chytridiomycota, and Monoblepharidomycota from freshwater and soil of the preserved Atlantic Rainforest area “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”.

## **Material and Methods**

### **Study area**

This study was performed at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” (24°21'18,2"S; 47°00'25,1"W), an Atlantic Rainforest area with approximately 110,000 hectares (Fig. 1). This conservation unit was implemented in December 2006 and has a very irregular and diverse topology with hills, mountains, plains, and beaches (Souza & Souza 2004; Tarifa 2004). The climate of the region is classified as subtropical permanently humid, without defined dry season, with an average temperature annual of

21.4°C and an average annual rainfall of 2,277.8 mm (Tarifa 2004; Fundação Florestal 2014).

### Sampling

We collected samples of soil (45) and submerged leaves (45), surface sediments (45), and water (45) from freshwater bodies at different areas of the conservation unit in August 2016, and February, June, and October 2017 (Tab. S1). Samples of soil were collected in plastic bags, whereas water, submerged leaves and surface sediments in sterile plastic containers. In October/2017, 5 fruits of *Malus* sp. (apple) were placed into perforated plastic containers and submerged at 15cm depth in “Cachoeira do Paraíso” (24°23'42.6"S-47°07'19.5"W) for 30 days. Afterward, the colonized fruits were removed and taken to the laboratory. All samples were transported to the laboratory in a cooler (4°C) to prevent desiccation and excessive temperature rise.

At each sampling date, the water temperature, pH, dissolved oxygen and conductivity and the soil temperature, pH and moisture were measured *in situ* with Horiba®U-51.

### Gross cultures, isolation, and species identification

In the laboratory, samples were processed using the multiple baiting technique (Sparrow 1960; Milanez 1989). Aliquots of water (30 mL), submerged leaves (10g), surface sediments (15g), and soil (15g) with (30mL) of sterile water were placed into Petri dishes containing different types of substrates: cellulosic (two pieces of 0.6cm diam. of cellophane, corn leaves, and onion skin; and two halves of *Sorghum* spp. seeds); keratinous (two pieces of 0.6cm diam. of snakeskin and strands of blonde hair); chitinous (two pieces of 0.6cm diam. of shrimp exoskeleton); and pine pollen grains. Except for

*Sorghum* spp. seeds, all other baits were added together in the samples. After incubation for 7–30 days at 21°C, the baits were observed under the microscope and when the specimens of interest were visualized, the baits were transferred to sterile Petri dishes with sterile distilled water and new baits. Specimens were isolated and purified on new baits and/or cultivated onto mPmTG (0.4g peptonized milk, 0.4g tryptone, 2.5g glucose, 13g agar and 1L distilled water) and MP<sub>5</sub> (4g maltose, 1g peptone, 13g agar and 1L distilled water), with the addition of 0.1g penicillin G and 0.1g streptomycin sulphate.

#### Morphological studies

The morphological structures of the specimens were characterized and measured through the observations of the baits, and pure cultures (when obtained), under a Leica DMLB2 compound microscope equipped with a Leica MC170 HD camera (Hessen, Wetzlar, Germany). Sparrow (1960), Karling (1977), and the original descriptions were used as references for species identification. The specimens obtained in pure culture were deposited in the CCIBt Culture Collection (“Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica”). The specimens that did not grow in culture media were deposited as permanent slides in the Herbarium SP.

#### DNA extraction, amplification and sequencing

For DNA extraction, pellets of biomass were obtained through liquid cultivation (25 mL of mPmTG) or bait cultivation. After washed of the pellets in distilled water, the DNA was extracted using PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). DNA amplification of the large subunit (LSU), small subunit (SSU) and internal transcribed spacer (ITS), regions of rDNA gene were performed using the primers LR0R/LR5, SR1R/NS4 (Vilgalys & Hester 1990) and ITS4/ITS5 (White et al. 1990), respectively. PCR

amplification followed the conditions described in Marano et al. (2014). The protocol described in Shmitz & Riesner (2006) was used to purified of amplicons. Sequencing was carried out in an ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies <sup>TM</sup>). The sequences obtained were edited manually using Sequencher 4.1.4 and published in database of the GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

## Ecological analyses

The total frequency (TF) was calculated based on the occurrence of each taxon per sampling date, as described in Marano et al. (2008). We used the Braun-Blanquet scale (Kershaw 1973; Letcher & Powell 2001) to categorize the frequency of the identified species into five groupings: ubiquitous = 80.1-100%, common = 60.1-80%, often present= 40.1-60%, scarce = 20.1-40% and rare = 0.1-20%. The total abundance (TA) of the identified species was based on the number of occurrences considering the presence or absence of them in each type of sample (Tab. 1).

The community structure was estimated by (i) the species richness ( $S$ ), (ii) Shannon diversity index  $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2(p_i)$ , where  $p_i$  is the abundance of the species  $i$  in the community, (iii) evenness  $E = H'/H'_{\max}$ , where  $H'_{\max}$  is the maximum value of the diversity for the number of present taxa, (iv) Simpson's dominance index  $D = 1/\sum_{i=1}^S (p_i)^2$  based on the species abundance (Hammer et al. 2001; Zak & Willig 2004). The Wilcoxon test was used to verify if the abundance and diversity measured were equal between the samples (Hammer et al. 2001).

## Results

### Physicochemical characteristics

The “Mosaico de Unidade de Conservação Juréia-Itatins” has a diverse topography and vegetation composition, ranging from “restinga” areas with dry soil to wet soil areas with dense vegetation. During the sampling, the minimum water temperature was 15.6°C in August/2016, and maximum (25.6°C) in February/2017. The pH varied between 4 and 7 during the studied period. Low and almost constant values were obtained for electrical conductivity (0.03-0.30  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Dissolved oxygen also showed a slight variation during the studied period (6.00-8.81  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), with good oxygenation in most sampling sites, except where the water colour was dark brown due to the presence of large amounts of decaying plant material and humic substances from the soil (3.30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). On the other hand, the soil temperature varied (15.63-26.40°C), with minimum temperatures in August/2016. All soil samples were acidic (pH 4.26-6.93), and a heterogeneous moisture, being the driest in “restinga” areas (3.7%) to the most humid in swamps areas (92%).

#### Community structure

One hundred and eighty-five samples (45 water, 45 soil, 45 submerged leaves, 45 surface sediments, and five *Malus* sp. fruits), and a total of 2.160 standardized baits and non-standardized baits (pollen grains and strands of blonde hair) were analysed. As shown in Figs. 2-5 and Tab. 1, we identified 46 taxa: Blastocladiomycota (2), Chytridiomycota (42) and Monoblepharidomycota (2), with 16 of them purified in pure culture and sequenced (Tab. 2).

*Chytrium appendiculatus* Karling and *Cladochytrium replicatum* Karling were the most frequent and abundant taxa in water samples, submerged leaves and surface sediments, and were considered as ubiquitous according to the Braun-Blanquet scale. *Gonapodya* sp. was the only species identified from submerged fruits, but since this



substrate cannot be compared with the other substrate types in the ecological analyses, this taxon was not included in the Tab. 1. *Podochytrium chitinophilum* Willoughby occurred only in water samples and *Entophlyctis texana* Karling only in submerged leaves. *Boothiomyces* sp., *Cladochytrium setigerum* Karling, *Monoblepharella* sp., *Nowakowskiella* sp. and *Siphonaria* sp. occurred exclusively in samples of surface sediments, whereas *Angulomyces argentinensis* Letcher, *Allomyces arbusculus* E.J. Butler, *Boothiomyces elyensis* Sparrow, *Kappamyces microporosus* A.L Jesus & C.L.A. Pires-Zottarelli, *Karlingiomyces dubius* (Karling) Sparrow, *Nowakowskiella elegans* (Nowak.) J. Schröt., *Rhizidium* sp., *Rhizophlyctis hyalina* (Karling) Sparrow and *Septosperma rhizophydii* Whiffen in soil samples. Most taxa were classified as rare according to the Braun-Blanquet scale.

Although the species richness (*S*) and occurrence were higher in soil and surface sediments than in water and submerged leaves, no significant differences ( $P \leq 0.05$ ) were found considering all diversity indices (richness, evenness, Shannon and Simpson) (Tabs. 1 and 3).

Most of the identified taxa colonized a single substrate type, and only seven occurred in more than one type (Tab. 1). Most taxa occurred on cellulosic substrates (26), followed by chitinous substrates (10), pollen (8), and keratinous substrates (7).

## Discussion

In this study, we analysed the diversity, frequency and abundance of Blastocladiomycota, Chytridiomycota and Monoblepharidomycota from freshwater and soil of an unexplored Atlantic Rainforest area. Almost all taxa, except *Rodmanochytrium* sp., were already reported in Brazil (Pires-Zottarelli et al. 1996; Rocha and Pires-Zottarelli 2002; Pires-Zottarelli and Gomes 2007; Pires-Zottarelli and Rocha 2007;

Nascimento and Pires-Zottarelli 2009, 2012; Jesus et al. 2013; Jerônimo et al. 2015, 2019a,b; Jesus & Pires-Zottarelli 2020).

*Cladochytrium replicatum* and *Chytriomycetes appendiculatus*, which were ubiquitous during the studied period, were also reported with high frequency in other studies in Brazil (Nascimento & Pires-Zottarelli 2009; Nascimento et al. 2011). As previously reported by Marano et al. (2008) and Nascimento et al. (2011), we also found that most species of zoosporic fungi exhibited scarce or rare occurrence in the aquatic environments studied.

The community of zoosporic fungi of “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” was diverse with a few dominant and abundant taxa. We recovered species belonging to the three phyla of zoosporic fungi, with members of the Chytridiomycota being the most frequent. These results might reflect the methodology used in the present study, since species of Blastocladiomycota and Monoblepharidomycota are usually found on submerged twigs and fruits or insect debris in aquatic environments (Sparrow 1960). Although the baiting technique method used herein does not favour the recovery of parasitic taxa, we found *Septosperma rhizophydii*, a parasitic species of *Rhizophydium* sp.

Most zoosporic fungi are able to decompose cellulosic substrates (Gleason et al. 2008, 2012), but some taxa grow exclusively on keratin, chitin or pollen. In our samples, *Boothiomycetes elyensis*, *Boothiomycetes* sp., *Cladochytrium replicatum*, *Phlyctochytrium aureliae* Ajello, *Polychytrium aggregatum* Ajello, and *Rhizidium* sp. occurred on various substrates, without specificity. In addition, some taxa were restricted to a particular sample type, whereas others were found in more than one type, indicating that each taxon might or might not exhibit habitat specificity (Willoughby 1961; Longcore 2005).

Studies analysing the diversity of zoosporic fungi in Brazilian preserved areas are still scarce. Up to date, most studies have focused on the description of new taxa and the resolution of phylogenetic clades. This study contributes to increasing the knowledge of the diversity, occurrence, and abundance of the zoosporic fungi in an unexplored preserved area of the Atlantic Rainforest.

### **Acknowledgements**

We are indebted to “Instituto Florestal” for the permission given to collect samples at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” and to Otto Hartung for his valuable help during sampling. We also wish to thank São Paulo Research Foundation – FAPESP for the fellowships given to A.L. Jesus (Process N°. 2016/00697-0) and for the financial support given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N°. 2016/11146-4). CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is also acknowledged for the grant given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N° 304091/2018-9) and CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”) for the financial support given to A.L. Jesus through post-graduation program.

### **References**

- Barr D.J.S. (1990) Phylum Chytridiomycota. In: Handbook of Protoctista (eds. Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M., Chapman D.J), Jones and Bartlett, Boston: 454–466
- Barr D.J.S. (2001) Chytridiomycota. In: In: The Mycota, Vol. VII, Part A, Systematics and Evolution (eds. Esser K, Lemke P.A.), Springer Verlag, New York: 93–112
- Dee J.M., Mollicone, M.R.N., Longcore J.E., Roberson R.W., Berbee M.L. (2015) Cytology and molecular phylogenetics of Monoblepharidomycetes provide evidence for multiple independent origins of the hyphal habit in the Fungi. *Mycologia* **107**:710–728.
- Doweld A. (2001) *Prosyllabus tracheophytorum: Tentamen systematis plantarum vascularium (Tracheophyta)*. Geos, Moscow.

- Fundação Florestal (2014) Estação Ecológica da Juréia Itatins. Sobre a Estação Ecológica; <https://www.ambiente.sp.gov.br/e-e-jureia-itatins/sobre-a-estacao> (accessed 12 May 2015).
- Gleason F.H., Kagami M., Lefevre E., Sime-Ngando T. (2008) The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biology Reviews* **22**:7–25.
- Gleason F.H., Kupper F.C., Glocking S. (2012) Zoosporic true fungi. In: *Marine Fungi and Fungal-like Organisms* (eds. Jones E.B.G., Pang K.L.), De Gruyter, Germany: 103–116
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**:1–9
- Hibbett D., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E. et al (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**:509–547.
- James T.Y., Letcher P.M., Longcore J.E., Mozley-Standridge S.E., Porter D., Powell M.J., Griffith G.W., Vilgalys R. (2006) A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* **98**:860–871.
- James T.Y., Porter T.M., Martin W.W. (2014) Blastocladiomycota. In: *Systematics and evolution* (eds. McLaughlin D.J., Spatafora J.W.), Springer, Heidelberg: 177–207
- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Marano, A.V., James, T.Y., Souza, J. I., Rocha, S.C.O., Pires-Zottarelli, C.L.A. (2015): Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP. Brasil. *Hoehnea* **42**:135–163.
- Jerônimo G.H., Jesus A.L., Simmons D.R., James T.Y., Pires-Zottarelli C.L.A. (2019a) Novel taxa in Cladochytriales (Chytridiomycota): *Karlingiella* (gen. nov.) and *Nowakowskiella crenulata* (sp. nov.). *Mycologia* **111**:506–516.
- Jerônimo G.H., Simmons D.R., James T.Y., Pires-Zottarelli C.L.A. (2019b) *Boothiomycetes angulosus* and *Boothiomycetes elyensis*: two new combinations in the Terramycetaceae (Rhizophydiales, Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* **109**:399–412.
- Jesus A.L., Marano A.V., Schoenlein-Crusius I.H., Pires-Zottarelli C.L.A. (2013) Diversidade de organismos zoospóricos do córrego Pirarungaua, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil: novas citações. *Hoehnea* **40**:167–180.
- Jesus A.L., Pires-Zottarelli C.L.A. (2020) Chytridiales and Rhizophydiales (Chytridiomycota): new species and new records for Brazil. *Nova Hedwigia* **110**:293–305.
- Karling J.S. (1977) *Chytridiomycetarum Iconographia*. Monticello, New York.

- Karpov S.A., Mamanazarova K.S., Popova P.V., Aleoshin V.V., James T.Y., Mamkaeva M.A., Tsvetkova V.S., Vishnyakov A.E., Longcore J.E. (2017) Monoblepharidomycetes diversity includes new parasitic and saprotrophic species with highly intronized rDNA. *Fungal Biology* **121**:729–741.
- Kershaw K.A. (1973) Quantitative and dynamic plant ecology. American Elsevier Publishing Co, New York.
- Letcher P.M., Powell M.J. (2001) Distributions of the Blue Ridge and Appalachian Mountains of Virginia. *Mycologia* **93**:1029–1041.
- Longcore J.E. (2005) Zoosporic fungi from Australian and New Zealand tree-canopy detritus.
- Longcore J.E., Pessier A.P., Nichols D.K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia* **91**:219–227.
- Maia L.C., Carvalho Jr. A.A. (2015) Fungos in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB120629> (access in: 25 May 2015).
- Marano A.V., Barrera M.D., Steciow M.M., Donadelli J.L., Saparrat M.C.N. (2008) Frequency, abundance and distribution of zoosporic organisms from Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina). *Mycologia* **100**: 691–700.
- Marano A.V., Jesus A.L., de Souza J.I., Leão E.M., James T.Y., Jerônimo G.H., de Cook A.W.A.M., Pires-Zottarelli (2014) A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* **5**:510–522.
- Milanez A.I. (1989) Fungos de águas continentais. In: Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico (Coords. Fidalgo O., Bononi V.L.), Série documentos, São Paulo: 17–20.
- Milanez A.I., Pires-Zottarelli C.L.A., Gomes A.L. (2007) Brazilian Zoosporic Fungi, São Paulo.
- Nascimento C.A., Pires-Zottarelli C.L.A. (2009) Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, SP. *Acta Botanica Brasilica* **23**:459–473.
- Nascimento C.A., Pires-Zottarelli C.L.A. (2012) Diversidade de fungos zoospóricos da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* **63**:587–611.
- Nascimento C.A., Gomes E.P.C., Pires-Zottarelli C.L.A. (2011) Occurrence and distribution of zoosporic organisms in water bodies from Brazilian Cerrado areas. *Mycologia* **103**:261–272.
- Pires-Zottarelli C.L.A., Milanez A.I., Schoenlein-Crusius I.H., Lohmann L.G. (1996) Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 6: Chytridiales. *Hoehnea* **23**:77–90.

- Pires-Zottarelli C.L.A., Gomes A.L. (2007) Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* **7**:309–329.
- Pires-Zottarelli C.L.A. Rocha M. (2007) Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **21**:125–136.
- Powell M.J., Letcher P.M. (2014) “Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota.” In: *The Mycota, Vol. VII, Part A, Systematics and Evolution* (eds. McLaughlin, D.J., Spatafora, J. W.), Springer, New York: 141–175
- Rocha M., Pires-Zottarelli C.L.A. (2002) Chytridiomycota e Oomycota da Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. *Acta Botanica Brasilica* **16**:287–309.
- Schmitz A., Riesner D. (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* **354**:311–313.
- Shearer C.A., Descals E., Kohlmeyer B., Kohlmeyer J., Marvanová L. et al (2007) Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation* **16**:49–67.
- Souza C.R.G, Souza A.P. (2004) Geologia e Geomorfologia da área da Estação Ecológica Juréia-Itatins. In: *Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna* (eds. Maruque O.A.V., Duleba W.), Holos, Ribeirão Preto: 16–33
- Sparrow F.K. (1960) *Aquatic Phycomycetes*. Ann Arbor, University of Michigan Press, Michigan.
- Tarifa J.R. (2004) Unidades Climáticas dos Maciços Litorâneos da Juréia-Itatins. In: *Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna* (eds. Maruque O.A.V., Duleba W.), Holos, Ribeirão Preto: 42–50
- Tedersoo L., Sánchez-Ramírez S., Kõljalg U., Bahram M., Doring M. et al (2018) High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* **90**:135–159.
- Vilgalys R., Hester M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**:4238–4246.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to the methods and applications* (eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.), Academic Press, New York: 315–322
- Willoughby L.G. (1961) Chitinophilic chytrids from lake muds. *Transactions of the British Mycological Society* **44**:586–592.

Zak J.C., Willig M.R. (2004) Fungal biodiversity patterns. In: Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods (eds. Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S.), Elsevier Academic Press, USA: 59–75.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

**Tab. 1.** Species composition, frequency, and abundance of Blastocladiomycota, Chytridiomycota and Monoblepharidomycota in different types of samples collected from “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” from August/2016 to October/2017. C=Cellulosic substrate, Ch=Chitinous substrate, K=Keratinous substrate, P=Pollen, Pa=Parasite, F=frequency, A=abundance, TF=total frequency and TA=total abundance

Taxa/Type of sample	Water		Surface sediments		Submerged leaves		Soil		TF (%)	TA
	F%	A	F%	A	F%	A	F%	A		
Fungi										
Blastocladiomycota										
Blastocladales										
Blastocladiaceae										
<i>Allomyces arbusculus</i> E.J. Buttler (C)							25	1	6.25	1
Catenariaceae										
<i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling (K)	50	2	25	2	25	1	50	3	37.5	8
Monoblepharidomycota										
Monoblepharidales										
Gonapodyaceae										
<i>Monoblepharella</i> sp. (C)			25	1					6.25	1
Chytridiomycota										
Chytridiomycetes										
Chytridiales										
Chytridiaceae										



Taxa/Type of sample	Water		Surface sediments		Submerged leaves		Soil		TF (%)	TA
	F%	A	F%	A	F%	A	F%	A		
<i>Karlingiomyces dubius</i> (Karling) Sparrow (K)							25	5	6.25	5
<i>K. granulatus</i> (Karling) Sparrow (C)			50	3	25	2	100	10	43.75	15
<i>Karlingiomyces marylandicus</i> (Karling) Sparrow (C)			75	4			50	4	31.25	8
<i>Phlyctochytrium aureliae</i> Ajello (C), (P)			25	1			50	8	18.75	9
<i>Phlyctochytrium reinboldtiae</i> Persiel (C), (P)			25	1			25	1	12.50	2
<i>Septosperma rhizophydii</i> Whiffen (Pa)							50	3	12.50	3
Chytriomycetaceae										
<i>Chytriomycetes appendiculatus</i> Karling (Ch)	100	20	100	24	100	21	100	6	100	71
<i>C. hyalinus</i> Karling (C), (Ch)	25	2	50	2	50	4	50	2	43.75	10
<i>Entophlyctis luteolus</i> Longcore (C)	25	3	25	2	25	1	50	5	31.25	11
<i>Entophlyctis</i> sp. (C)			50	2	50	2			25	4
<i>Entophlyctis texana</i> Karling (C)					25	1			6.25	1
<i>Fayochoytrium spinosus</i> (Fay) W.J. Davis, Letcher, Longcore & M.J. Powell (C)	25	6	75	12	50	7	25	5	43.75	30
<i>Podochytrium chitinophilum</i> Willoughby (Ch)	25	1							6.25	1
<i>Siphonaria</i> sp. (Ch)			25	4					6.25	4
<i>Rhizidium</i> sp. (Ch), (K)							25	8	6.25	8
<i>Rhizoclostridium globosum</i> H. E. Petersen (Ch)	100	23	100	8	75	8	25	1	75	40
<i>Rodmanochytrium</i> sp. (Ch)	25	1							6.25	1
Cladochytriomycetes										
Cladochytriales										
Cladochytriaceae										
<i>Cladochytrium replicatum</i> Karling (C), (P)	100	13	100	14	100	19	50	3	87.50	49
<i>C. setigerum</i> Karling (C)			25	1					6.25	1
<i>C. tenue</i> Nowak. (C)	25	1	50	5	25	1	75	11	43.75	18
Endochytriaceae										

Taxa/Type of sample	Water		Surface sediments		Submerged leaves		Soil		TF (%)	TA
	F%	A	F%	A	F%	A	F%	A		
<i>Asterophlyctis sarcoptoides</i> H.E. Petersen (Ch)	50	2	25	1	25	1			25	4
<i>Catenochytridium kevorkianii</i> Sparrow (K)					25	1			6.25	1
<i>Diplophlyctis asteroidea</i> Dogma (Ch)			50	4	25	1			18.75	5
<i>D. intestina</i> (Schenk) J. Schröt. (C)			25	1	25	1			12.50	2
<i>Endochytrium operculatum</i> (De Wild.) Karling (C)	25	2			25	1			12.50	3
Nowakowskiellaceae										
<i>Nowakowskiella elegans</i> (Nowak.) J. Schröt. (C)							25	1	6.25	1
<i>N. hemisphaerospora</i> Shanor (C)			75	8	100	4	25	1	50	13
<i>N. multispora</i> Karling (C)	25	1	50	4	50	6	25	1	37.50	12
<i>N. ramosa</i> E.J. Butler (C)	25	1			25	4			12.50	5
<i>Nowakowskiella</i> sp. (C)			25	1					6.25	1
Septochytriaceae										
<i>Septochytrium variabile</i> Berdan (C)	25	1	50	2					18.75	3
<i>Septochytrium willoughbyi</i> Dogma (C)			25	2			100	14	31.25	16
<i>Incertae sedis</i>										
<i>Karlingiella elongata</i> (Karling) Jerônimo, Jesus & Pires-Zottarelli (C)	25	1	25	2	25	4	50	4	31.25	11
Polychytriomycetes										
Polychytriales										
Polychytriaceae										
<i>Polychytrium aggregatum</i> Ajello (Ch), (K)	25	2	25	3			50	6	25	11
Rhizophydiomycetes										
Rhizophydiales										

Taxa/Type of sample	Water		Surface sediments		Submerged leaves		Soil		TF (%)	TA
	F%	A	F%	A	F%	A	F%	A		
Angulomycetaceae										
<i>Angulomyces argentinensis</i> Letcher (P)							25	1	6.25	1
Globomycetaceae										
<i>Globomyces pollinis-pini</i> (A. Braun) Letcher (P)	25	1	50	2			25	12	25	15
Kappamycetaceae										
<i>Kappamyces microporosus</i> A.L. Jesus & C.L.A. Pires-Zottarelli (P)							25	1	6.25	1
Terramycetaceae										
<i>Boothiomyces elyensis</i> Sparrow (K), (P)							25	4	6.25	4
<i>Boothiomyces</i> sp. (K), (P)			25	1					6.25	1
Rhizophlyctidiomycetes										
Rhizophlyctidales										
Rhizophlyctidaceae										
<i>Rhizophlyctis rosea</i> (de Bary & Woronin) A. Fisch. (C)			50	2			100	10	31.25	12
<i>R. hyalina</i> (Karling) Sparrow (C)							25	2	6.25	2
<i>Rhizophlyctis</i> sp. (K)	25	1					75	7	25	8
<b>Total taxa (S)</b>	<b>19</b>		<b>29</b>		<b>20</b>		<b>29</b>			
<b>Total occurrence</b>	<b>84</b>		<b>119</b>		<b>90</b>		<b>140</b>			

**Tab. 2.** Taxa, voucher and GenBank accession numbers of sequenced isolates.

NA=sequence not available

Taxa	Voucher	GenBank Accession Numbers		
		SSU	ITS	LSU
<i>Allomyces arbuscula</i>	CCIBt4411	MT409101	MT412115	MT418676
<i>Angulomyces argentinensis</i>	SP512583	MN511693	MN509013	MN508392
<i>Boothiomycetes elyense</i>	CCIBt4547	MN511695	MN509015	MN508394
<i>Boothiomycetes sp.</i>	CCIBt4414	MN511694	MN509014	MN508393
<i>Chytriomycetes hyalinus</i>	SP512558	MT406240	MT410712	MT406231
<i>Chytriomycetes hyalinus</i>	CCIBt4410	MT406241	MT410713	MT406232
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4390	MH590086	MH590048	MH590073
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt4427	MT409105	MT412118	MT418679
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4389	MT406242	MT410714	NA
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4412	MT406243	MT410715	MT406233
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4392	MT406244	MT410716	NA
<i>Kappamyces microporosus</i>	CCIBt4548	MN511698	NA	MN508397
<i>Karlingiella elongata</i>	ALJ09/SP512555	NA	MH590050	MH590075
<i>Monoblepharella sp.</i>	CCIBt4395	MT409102	MT4012116	MT418677
<i>Nowakowskiella elegans</i>	CCIBt4426	MH590091	MH590053	MH590079
<i>Polychytrium aggregatum</i>	ALJ30/SP512565	MH590095	MH590057	MH590083
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt4393	MT409103	NA	NA
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt4394	MT409104	MT412117	MT418678
<i>Rhizidium sp.</i>	SP512582	MT406246	MT410718	MT406236
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	CCIBt4413	MN511696	MN509016	MN508395
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	ALJ27	MT409098	MT412113	MT418673
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	CCIBt4415	MN511697	MN509017	MN508396
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	ALJ29	MT409099	MT412114	MT418674
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	ALJ40	MT409100	NA	MT418675
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	ALJ1	MT409097	MT412112	MT418672
<i>Rodmanochytrium sp.</i>	CCIBt5456	MT406245	MT410717	MT406235
<i>Siphonaria sp.</i>	CCIBt4685	MT406247	MT410719	MT406237

**Tab. 3.** Species richness (*S*), evenness (*E*), Shannon diversity (*H'*) and Simpson dominance (*D*) indices in each of the samples collected. The same letters indicate that the values do not differ significantly ( $P \leq 0.05$ )

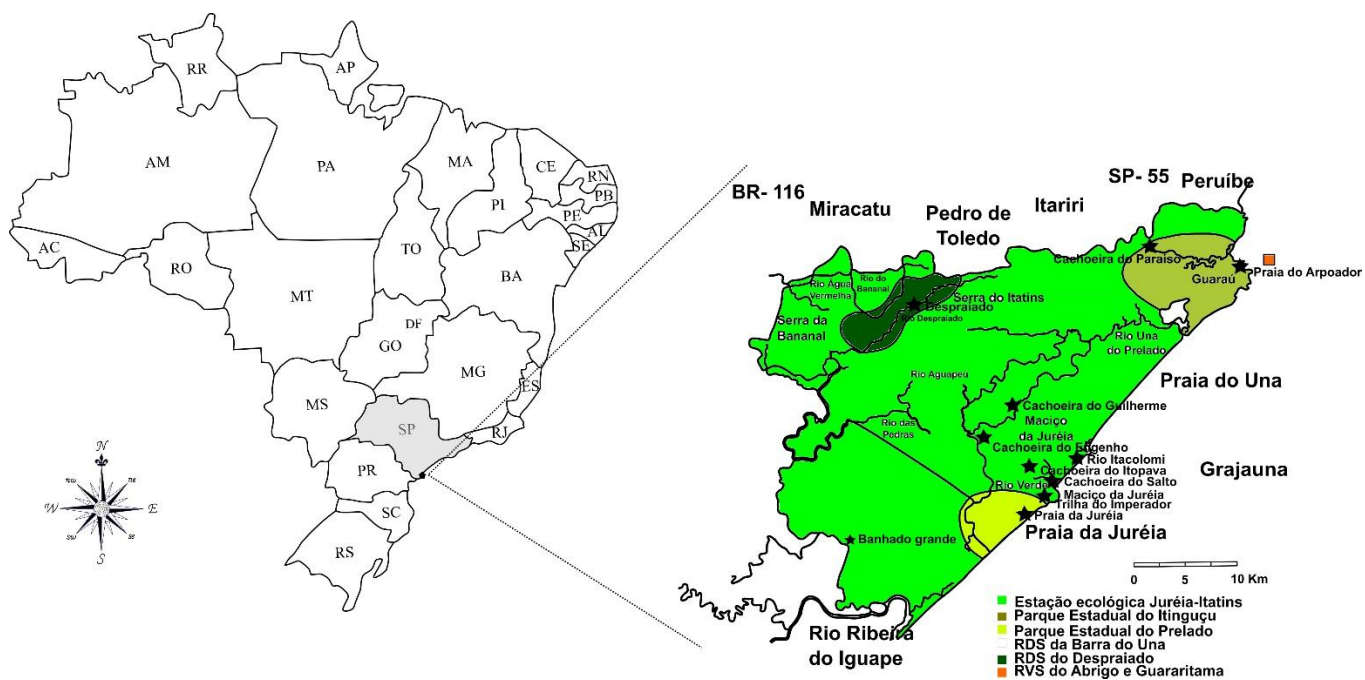
Index	Water	Surface sediments	Submerged leaves	Soil
<i>S</i>	19a	29a	20a	29a
<i>E</i>	0.48a	0.61a	0.57a	0.74a
<i>H'</i>	2.21a	2.88a	2.43a	3.07a
<i>D</i>	0.16a	0.08a	0.12a	0.05a

Supplementary material

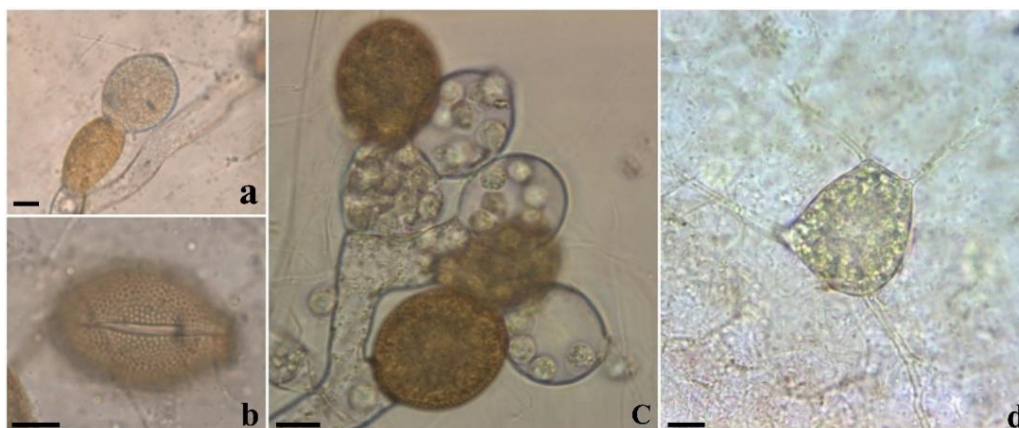
**Tab. S1.** Geographical coordinates of the sampling areas of the “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”

Water, surface sediments and submerged leaves from freshwater bodies				Soil		
Collection area	Coordinates		Collection area	Coordinates		
	South	West		South	West	
A1	Parque Estadual Itinguçu	24°23'42,6"	47°07'19,5"	Parque Estadual Itinguçu	24°23'46,7"	47°07'17,9"
A2	Parque Estadual Itinguçu	24°23'47,0"	47°07'18,6"	Parque Estadual Itinguçu	24°22'29,6"	47°04'02,0"
A3	Parque Estadual Itinguçu	24°22'29,6"	47°04'02,0"	Parque Estadual Itinguçu	24°23'45,0"	47°00'42,6"
A4	Parque Estadual Itinguçu	24°23'45,0"	47°00'42,6"	Parque Estadual Itinguçu	24°23'20,8"	47°00'55,6"
A5	Parque Estadual Itinguçu	24°23'15,5"	47°01'01,0"	Parque Estadual Itinguçu	24°21'14,9"	47°00'27,8"
A6	Parque Estadual Itinguçu	24°21'14,0"	47°00'23,9"	EE Juréia-Itatins	24°30'18,9"	47°15'48,8"
A7	EE Juréia-Itatins	24°30'27,4"	47°15'40,1"	EE Juréia-Itatins	24°30'01,6"	47°15'59,1"
A8	EE Juréia-Itatins	24°30'26,8"	47°15'42,8"	EE Juréia-Itatins	24°31'35,5"	47°17'12,4"
A9	EE Juréia-Itatins	24°30'25,9"	47°15'42,8"	RDS do Despraiado	24°21'56,7"	47°18'20,9"
A10	EE Juréia-Itatins	24°30'04,7"	47°15'58,0"	RDS do Despraiado	24°21'57,3"	47°18'22,4"
A11	EE Juréia-Itatins	24°31'35,3"	47°17'12,3"	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"
A12	EE Juréia-Itatins	24°31'35,5"	47°17'12,4"	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"
A13	RDS do Despraiado	24°21'56,7"	47°18'20,9"	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"
A14	RDS do Despraiado	24°21'57,8"	47°18'21,6"	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"
A15	RDS do Despraiado	24°21'57,3"	47°18'22,4"	EE Juréia-Itatins	24°23'10,2"	47°21'09,6"
A16	RDS do Despraiado	24°21'57,3"	47°18'22,4"	EE Juréia-Itatins	24°32'25,1"	47°12'33,6"
A17	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"	EE Juréia-Itatins	24°32'28,1"	47°12'38,8"
A18	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"	EE Juréia-Itatins	24°32'39,6"	47°13'12,7"
A19	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"	EE Juréia-Itatins	24°32'42,5"	47°13'49,9"
A20	RDS do Despraiado	24°22,5'51,4"	47°20'39,0"	EE Juréia-Itatins	24°32'42,5"	47°13'49,9"
A21	RDS do Despraiado	24°23'40,6"	47°21'40,2"	EE Juréia-Itatins	24°32'53,0"	47°14'05,4"
A22	RDS do Despraiado	24°23'40,6"	47°21'40,2"	EE Juréia-Itatins	24°33'08,3"	47°13'10,5"
A23	RDS do Despraiado	24°23'40,6"	47°21'40,2"	EE Juréia-Itatins	24°33'11,1"	47°13'34,5"

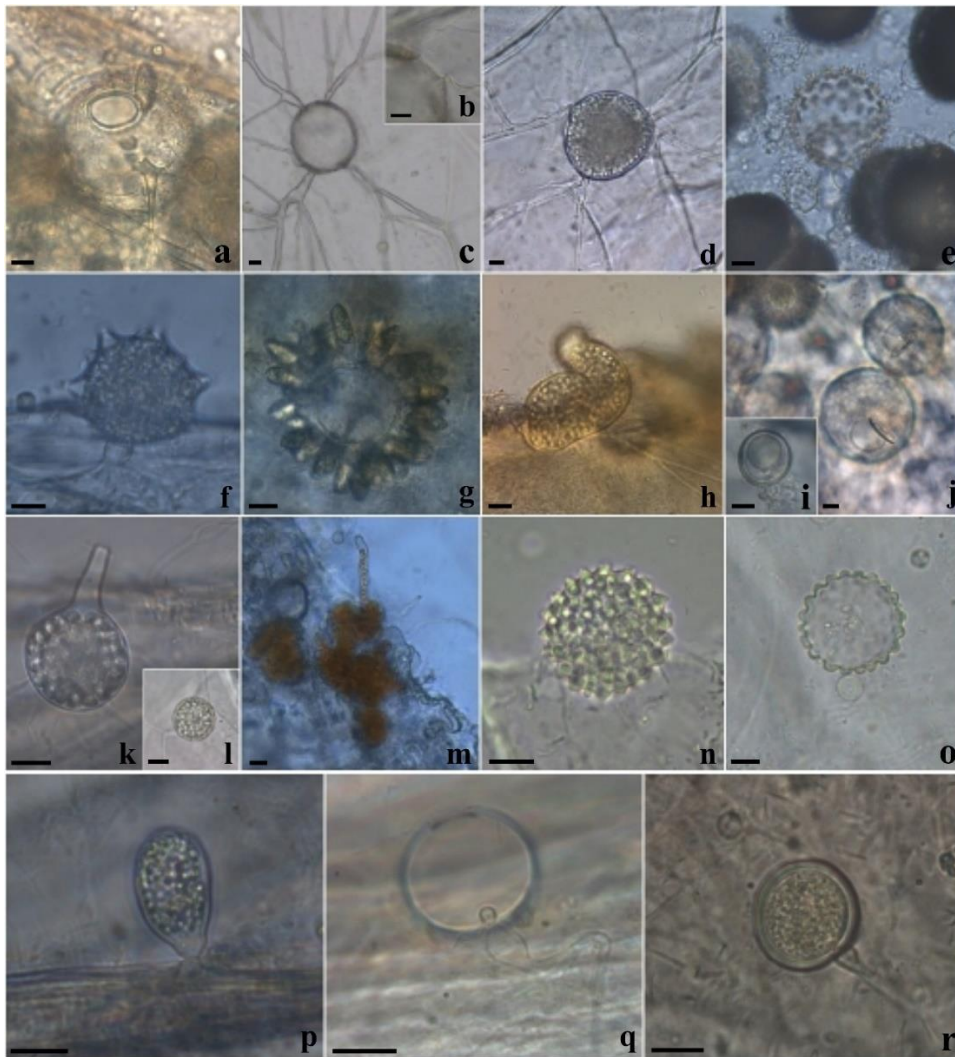
Water, surface sediments and submerged leaves from freshwater bodies				Soil		
A24	RDS do Despraiado	24°23'10,2"	47°21'09,6"	EE Juréia-Itatins	24°33'15,2"	47°14'10,5"
A25	EE Juréia-Itatins	24°32'25,1"	47°12'33,6"	EE Juréia-Itatins	24°33'15,2"	47°14'10,5"
A26	EE Juréia-Itatins	24°32'28,1"	47°12'38,8"	Parque Estadual do Prelado	24°34'18,5"	47°26'41,5"
A27	EE Juréia-Itatins	24°32'39,6"	47°13'12,7"	Parque Estadual do Prelado	24°34'18,5"	47°26'41,5"
A28	EE Juréia-Itatins	24°32'42,5"	47°13'50,5"	Parque Estadual do Prelado	24°34'18,5"	47°26'41,5"
A29	EE Juréia-Itatins	24°32'42,5"	47°13'49,9"	Parque Estadual do Prelado	24°34'18,5"	47°26'41,5"
A30	EE Juréia-Itatins	24°32'42,5"	47°13'49,9"	Parque Estadual do Prelado	24°34'15,2"	47°26'17,7"
A31	EE Juréia-Itatins	24°32'42,5"	47°13'49,9"	Parque Estadual do Prelado	24°34'16,8"	47°26'34,5"
A32	EE Juréia-Itatins	24°32'53,0"	47°14'05,4"	Parque Estadual do Prelado	24°34'05,3"	47°26'50,7"
A33	EE Juréia-Itatins	24°33'15,2"	47°14'10,5"	Parque Estadual do Prelado	24°32'39,5"	47°29'22,1"
A34	EE Juréia-Itatins	24°33'15,2"	47°14'10,5"	Parque Estadual do Prelado	24°32'39,5"	47°29'22,1"
A35	EE Juréia-Itatins	24°33'15,2"	47°14'10,5"	Parque Estadual do Prelado	24°32'39,5"	47°29'22,1"
A36	EE Juréia-Itatins	24°23'42,6"	47°07'19,5"	Parque Estadual do Prelado	24°32'39,5"	47°29'22,1"
A37	Parque Estadual do Prelado	24°34'18,5"	47°26'41,5"	Parque Estadual do Prelado	24°34'13,7"	47°14'0,6"
A38	Parque Estadual do Prelado	24°34'18,5"	47°26'41,5"	Parque Estadual do Prelado	24°34'13,7"	47°14'0,6"
A39	Parque Estadual do Prelado	24°34'13,7"	47°14'0,6"	Parque Estadual do Prelado	24°34'13,6"	47°14'06,0"
A40	Parque Estadual do Prelado	24°34'13,7"	47°14'0,6"	Parque Estadual do Prelado	24°34'15,4"	47°14'07,0"
A41	Parque Estadual do Prelado	24°34'13,6"	47°14'0,6"	Parque Estadual do Prelado	24°34'15,5"	47°14'14,0"
A42	Parque Estadual do Prelado	24°34'15,4"	47°14'07,0"	Parque Estadual do Prelado	24°34'17,4"	47°14'17,6"
A43	Parque Estadual do Prelado	24°34'15,5"	47°14'14,0"	Parque Estadual do Prelado	24°34'21,1"	47°14'39,3"
A44	Parque Estadual do Prelado	24°34'15,5"	47°14'14,0"	Parque Estadual do Prelado	24°34'21,1"	47°14'53,0"
A45	Parque Estadual do Prelado	24°34'21,1"	47°14'53,0"	Parque Estadual do Prelado	24°34'21,1"	47°14'53,0"



**Fig. 1.** Map of the “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” showing the location of the collection sites.

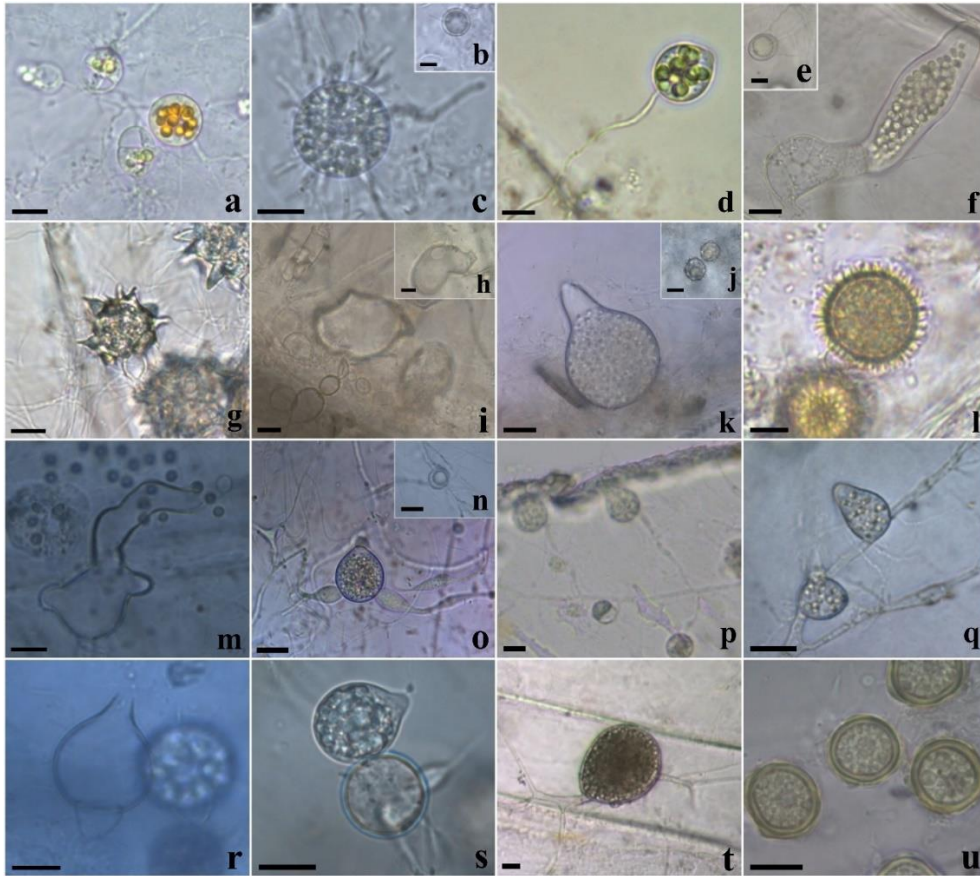


**Fig. 2 a-d.** Blastocladiomycota. a-c. *Allomyces arbusculus* on *Sorghum* spp. seeds. a. Male (orange) and female (incolor) gametangia. b. Ruptured meiosporangia. c. Mitosporangia (incolor) and meiosporangia (orange). d. Zoosporangium of *Catenophlyctis variabilis* on snakeskin. Bars=10µm.

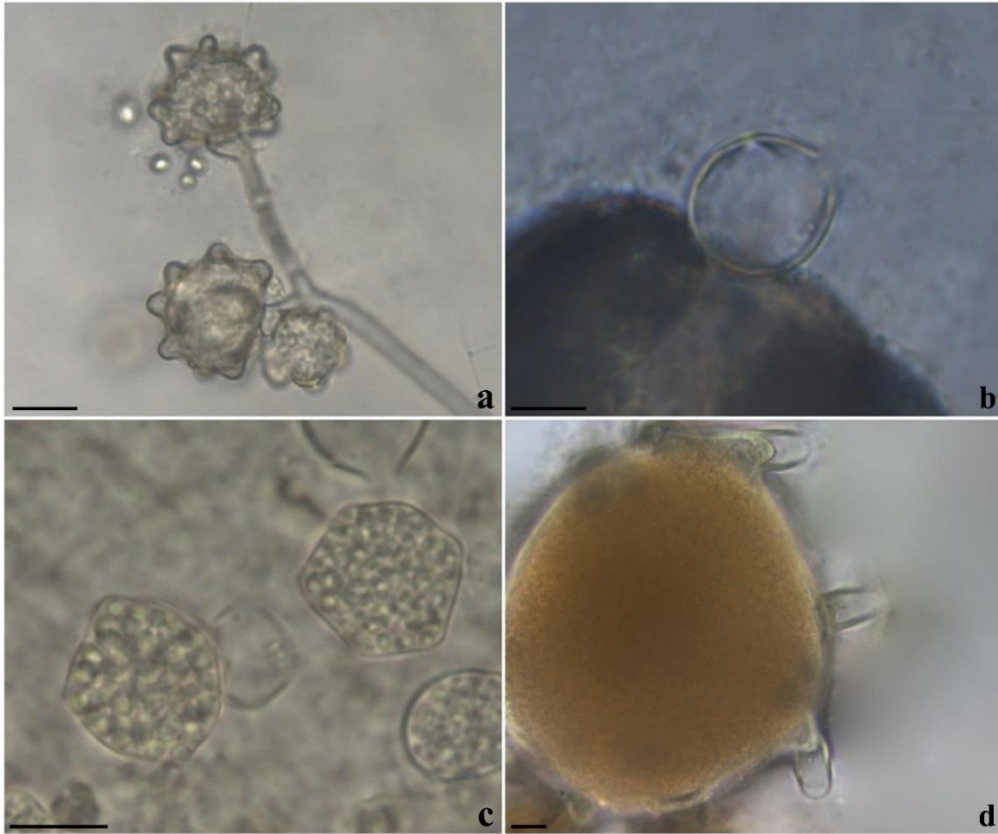


**Fig. 3 a-r.** Chytridiomycota (Chytridiales). a. Zoosporangium of *Karlingiomyces dubius* on snakeskin. b-c. *Karlingiomyces granulatus* onion skin. b. Operculum. c. Zoosporangium with irregularly constricted rhizoidal axes. d. Zoosporangium of *Karlingiomyces marylandicus* onion skin. e. Zoosporangium of *Phlyctochytrium aureliae* on pollen grains. f. Zoosporangium of *Phlyctochytrium reinboldtiae* on onion skin. g. *Septosperma rhizophydii* on *Rhizophydium* sp. h. Zoosporangium of *Chytriomycetes appendiculatus* on shrimp exoskeleton. i-j. *Chytriomycetes hyalinus* on onion skin. i. Resting spore. j. Operculate zoosporangium. k-l. *Entophlyctis luteolus* on onion skin. k. Zoosporangium. l. Resting spore. m. Zoosporangium of *Entophlyctis texana* on corn leaves. n-o. *Fayochytriomycetes spinosus* on onion skin. n. Zoosporangium. o. Empty zoosporangium. p. Zoosporangium of *Podochytrium chitinophilum* on shrimp exoskeleton. q-r. *Rhizoclosmatium globosum* on shrimp exoskeleton. q. Empty zoosporangium with apophysis. r. Resting spore. Bars=10 $\mu$ m.





**Fig. 4. a-u.** Chytridiomycota (Cladochytriales). a. Zoosporangium and rhizomycelium of *Cladochytrium replicatum* on onion skin. b-c. *Cladochytrium setigerum* on onion skin. b. Resting spore. c. Zoosporangium with branched setae. d. Zoosporangium of *Cladochytrium tenue* on onion skin. e-f. *Karlingiella elongata* on onion skin. e. Resting spore. f. Zoosporangium with sterile basal part. g. Zoosporangia of *Asterophlyctis sarcoptoides* on shrimp exoskeleton. h-i. *Catenochytridium kevorkianii* on onion skin. h. Operculate zoosporangium. i. Zoosporangium with catenulate rhizoids. j-k. *Diplophlyctis asteroidea* on shrimp exoskeleton. j. Resting spore. k. Zoosporangium. l. Resting spore of *Diplophlyctis intestina* on onion skin. m. Zoosporangium of *Endochytrium operculatum* on onion skin. n-o. *Nowakowskiella elegans* on corn leaves. n. Resting spore. o. Zoosporangium. p. Rhizomycelium of *Nowakowskiella hemisphaerospora* on cellophane. q. Rhizomycelium of *Nowakowskiella multispora* on cellophane. r-s. *Nowakowskiella ramosa* on corn leaves. r. Zoosporangia. s. Prosporangium. t. Zoosporangium of *Septochytrium variabilis* on onion skin. u. Resting spore of *Septochytrium willoughbyi* on onion skin. Bars=10 $\mu$ m.



**Fig. 5 a-d.** Chytridiomycota. a. (Polychytriales). Zoosporangia of *Polychytrium aggregatum* on shrimp exoskeleton. b-c. Rhizophydiales. b. Zoosporangium of *Globomyces pollinis-pini* on pollen grain. c. Zoosporangia of *Boothomyces elyensis* on snakeskin. d. Rhizophlyctidales. d. Zoosporangium of *Rhizophlyctis rosea* on cellophane. Bars=10 $\mu$ m.

## **CAPÍTULO II**

(Artigo publicado na revista Nova Hedwigia 110:293–305)



## Chytridiales and Rhizophydiales (Chytridiomycota): new species and new records for Brazil

Ana Lucia de Jesus<sup>1\*</sup> and Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, São Paulo, SP CEP 04301-912, Brazil.

\* Corresponding author: analuciajesus@hotmail.com

With 3 figures and 1 table

**Abstract:** During a survey of Chytridiomycota in the “Mosaico de Unidade de Conservação Juréia-Itatins”, São Paulo State from August/2016 to October/2017, we identified new records for Brazil: *Karlingiomyces marylandicus*, *Podochytrium chitinophilum* and *Rhizoclostridium globosum* in the Chytridiales and *Angulomyces argentinensis* in the Rhizophydiales. In addition, we found and describe a new species, *Kappamyces microporosus* (Kappamycetaceae, Rhizophydiales). All taxa were analysed morphologically and illustrated. The phylogeny of the Rhizophydiales members was inferred based on combined partial LSU and ITS rDNA regions.

**Keywords:** Atlantic Rainforest; chytrid; diversity; taxonomy

### Introduction

In recent years, molecular phylogeny and zoospore ultrastructure have significantly changed the taxonomy of Chytridiomycota (Powell 1993, Letcher & Powell 2005, Letcher & Powell 2014, Powell & Letcher 2014). Currently, this phylum contains 13 orders. Among them, the Chytridiales and Rhizophydiales are the orders with the most species (Powell & Letcher 2014, Seto & Degawa 2018). Members of this phylum, commonly known as chytrids, are cosmopolitan and found in aquatic and terrestrial environments as saprobes or parasites of different hosts (Karling 1977, Sparrow 1960, Powell 1993).

Chytridiales sensu Barr (2001) was the first order described in the phylum. Currently, it is composed of approximately 215 species, 21 genera and three families: Asterophlyctaceae, Chytridiaceae and Chytriomycetaceae (Letcher et al. 2018). These chytrids produce a eucarpic thallus, which can be monocentric, polycentric or both, with zoospore discharge from operculate or inoperculate zoosporangia (Powell & Letcher 2014). Letcher et

al. (2006) segregated Rhizophydiales from Chytridiales based on combined analyses of thallus morphology, zoospore ultrastructure, and phylogeny. This order contains about 220 described taxa, which have eucarpic and normally monocentric thalli, are either operculate or inoperculate, and are classified into the families Alphamycetaceae, Angulomycetaceae, Aquamycetaceae, Batrachochytriaceae, Globomycetaceae, Gorgonomycetaceae, Kappamycetaceae, Pateramycetaceae, Protrudomycetaceae, Rhizophydiaceae and Terramycetaceae (Sparrow 1960, Powell & Letcher 2014, Letcher et al. 2018).

In Brazil, the number of known taxa is small, with only 8 genera and 24 species of Chytridiales, and 5 genera and 24 species of Rhizophydiales, mostly collected in Atlantic Rainforest areas (Pires-Zottarelli et al. 1996, Rocha & Pires-Zottarelli 2002, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012, Jesus et al. 2013, Jerônimo et al. 2015).

During a survey of Chytridiomycota carried out at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, an important preserved fragment of Brazilian Atlantic Rainforest without previous records of chytrids, we found some species of Chytridiales and Rhizophydiales for the first time in Brazil. We also found a species of Rhizophydiales that is new to science. In this paper, these species are analysed morphologically, commented and illustrated. In addition, we inferred the phylogeny of the Rhizophydiales members from combined partial LSU and ITS rDNA sequence data.

## Materials and methods

### Site and sampling

We collected samples of soil, water, submerged leaves and surface sediments from freshwater bodies of “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, from August/2016 to October/2017. This conservation unit covers an important area of Atlantic Rainforest of approximately 84,425 ha distributed among hills, mountains, plains and beaches (Souza & Souza 2004). The climate of the region is classified as subtropical permanently humid, without defined dry season, with an average annual temperature of 21.4 °C and an average annual rainfall of 2,277.8 mm (Tarifa 2004, Fundação Florestal 2014).

### Species isolation

In the laboratory, we placed samples in Petri dishes with pollen, onionskin, and chitin baits as described in Milanez (1989). After incubation at 21 °C for 7–30 days, we observed the baits under the microscope. Baits that yielded growth of Chytridiomycota were separated in Petri dishes containing sterile distilled water and new baits. Whenever possible, fungi were isolated and purified onto mPmTG culture medium (0.4 g peptonized milk, 0.4 g tryptone, 2.5 g glucose, 6.5g agar and 1L distilled water).

## Morphological studies

Chytrid morphology and development were characterized by observations of baits and pure cultures under a Leica DMLB2 compound microscope and we photographed chytrids with a Leica MC170 HD camera with Leica Qwin 3.1 software (Hessen, Wetzlar, Germany). We identified taxa by consulting Sparrow (1960), Karling (1977), and original species descriptions. We deposited pure cultures in the CCIBt Culture Collection (“Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias”) of “Instituto de Botânica.” Isolates that did not grow in culture medium were deposited as permanent slides in the Herbarium SP.

## DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA was extracted from pure cultures using the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). The partial LSU, SSU, and ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) regions were amplified using the primers LR0R/LR5, SR1R/NS4 (Vilgalys & Hester 1990) and ITS4/ITS5 (White et al. 1990), respectively. PCR amplification followed the conditions described in Marano et al. (2014). Amplicons were purified using the protocol described in Shmitz & Riesner (2006). Sequencing was carried out in an ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™). Assembly of contigs and correction of ambiguous bases were performed manually using Sequencher 4.1.4.

## Phylogenetic analyses

We created a single dataset with the ITS1-5.8S-ITS2 and LSU rDNA gene sequences of 39 taxa of Rhizophydiales, using *Spizellomyces punctatus* SW001 and *S. plurigibbosus* CBS668.73 as outgroup. The sequences were aligned using MAFFT 7 with default settings (Kazutaka & Daron 2013) and adjusted manually in BioEdit (Hall 1999). The best-fitting model of evolution was selected using the Akaike Information Criterion in jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). The dataset was concatenated using SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al. 2010), resulting in a final length of 1929 bp. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) phylogenies were reconstructed with RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) and MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) using the CIPRES Science Gateway platform (<https://www.phylo.org/>). We performed the ML analysis with 1000 bootstrap (bs) replicates and the BI using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methodology to calculate posterior probabilities (pp). The program was run for five million generations and the first 10% of the iterations were discarded as burn-in and sampled every 1000th iterations from the remainder (Table 1).

**Table 1.** Taxa, vouchers and GenBank accession numbers used in the molecular analysis of Rhizophydiales. NA: sequence not available.

Taxa	Voucher	GenBank Accession Number	
		ITS	LSU
<i>Alphamyces chaetifer</i>	ARG025	EF585646	EF585606
<i>Alphamyces chaetifer</i>	ARG028	EF585649	EF585609
<i>Alphamyces chaetifer</i>	ARG58	EF585663	EF585623
<i>Angulomyces argentinensis</i>	ARG008	EF585635	EF585595
<i>Angulomyces argentinensis</i>	ARG015	EF585640	EF585600
<i>Angulomyces argentinensis</i>	ARG070	EF585667	EF585627
<i>Angulomyces argentinensis</i>	ALJ54	MN509013	MN508392
<i>Aquamyces chlorogonii</i>	ARG018	EF585643	EF585603
<i>Aquamyces chlorogonii</i>	Barr102	DQ485600	DQ485536
<i>Boothiomycetes macroporosum</i>	Plaus021	NR119591	AY439040
<i>Boothiomycetes</i> sp.	ARG040	EF585656	EF585616
<i>Boothiomycetes</i> sp.	CCIBt4414	MN509014	MN508393
<i>Boothiomycetes</i> sp.	CCIBt4547	MN509015	MN508394
<i>Globomyces pollinis-pini</i>	ARG068	EF585665	EF585625
<i>Globomyces pollinis-pini</i>	ARG069	EF585666	EF585626
<i>Gorgomyces haynaldii</i>	ARG024	EF585645	EF585605
<i>Gorgomyces haynaldii</i>	ARG026	EF585647	EF585607
<i>Gorgomyces haynaldii</i>	Barr106	DQ485601	DQ485537
<i>Kappamyces laurelensis</i>	PL098	DQ485666	AY439034
<i>Kappamyces laurelensis</i>	CBS122.106	MH863176	MH874722
<i>Kappamyces</i> sp.	PL117	EF585670	EF585630
<i>Kappamyces</i> sp.	PL120	DQ485672	DQ485581
<i>Kappamyces microporosus</i>	CCIBt4548	NA	MN508397
<i>Pateramyces corrientinensis</i>	ARG046	EF585657	EF585617
<i>Protrudomyces lateralis</i>	ARG047	EF585658	EF585618
<i>Protrudomyces lateralis</i>	ARG071	EF585668	EF585628
<i>Protrudomyces lateralis</i>	ARG072	EF585669	EF585629
<i>Rhizophydium globosum</i>	JEL222	DQ485616	DQ485551
<i>Rhizophydium globosum</i>	CBS120.403	MH863084	MH874643
<i>Rhizophydium sphaerotheca</i>	BR89	JN943817	JN941000
<i>Rhizophydium</i> sp.	PL139	DQ485677	DQ485586
<i>Rhizophydium</i> sp.	Barr436	DQ485607	DQ485543
<i>Terramyces subangulosum</i>	PL001	DQ485652	NA
<i>Terramyces subangulosum</i>	PL003	DQ485653	AY439041
<i>Terramyces subangulosum</i>	PL122	DQ485673	DQ485582
<i>Urceomyces sphaerocarpus</i>	ARG038	EF585655	EF585615
<i>Urceomyces sphaerocarpus</i>	ARG048	EF585659	EF585619
<i>Spizellomyces punctatus</i>	SW001	EU379241	EU379198
<i>Spizellomyces plurigibbosus</i>	CBS668.73	NR145374	JN941011

## Results

Of all taxa of Chytridiomycota obtained, *Karlingiomyces marylandicus* (Karling) Sparrow, *Podochytrium chitinophilum* Willoughby, *Rhizoclostridium globosum* Petersen (Chytridiales) and *Angulomyces argentinensis* Letcher (Rhizophydiales) are new records for Brazil. In addition, one species of Rhizophydiales herein named *Kappamyces microporosus*, is new to science. We were unable to obtain pure cultures of *Karlingiomyces marylandicus* and *Podochytrium chitinophilum*. The DNA of *Angulomyces argentinensis*, *Kappamyces microporosus*, and *Rhizoclostridium globosum* was amplified and their sequences deposited in GenBank. All species are described, commented and illustrated below.

## Morphological descriptions

### *Chytridiales*

#### Chytridiaceae

*Karlingiomyces marylandicus* (Karling) Sparrow, Aquatic Phycomycetes: 562, 1960.

≡ *Karlingia marylandica* Karling, Mycologia 41(5): 518, 1949. Figs. 1D–F

Thallus eucarpic, monocentric. Extensive rhizoids with axes usually arising from different points on the zoosporangium, some of them irregularly constricted. Zoosporangia exo-operculate, sometimes endo-operculate, 10–17.5 µm; spherical, oval, pyriform, 27.5–37.5 × 85–190 µm, smooth-walled. Zoospores spherical, 5–7.5 µm diam., with a colourless lipid globule; discharge by one papilla, varying from nearly sessile to an elongate tube. Resting spores not observed.

**Material examined:** Brazil, São Paulo State, Iguape, Pedro de Toledo and Peruíbe, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia Itatins, 24 Aug. 2016, 13 Feb. 2017, 24 Jun. 2017 and 28 Oct. 2017, from surface sediment and soil samples, on onion skin and corn leaves. Leg. & det. A.L. Jesus and C.L.A. Pires-Zottarelli.

**Notes:** The morphology of our isolates are in agreement with the original description of Karling (1949) and Sparrow (1960). Here we are using the classification of Sparrow (1960) placing this species within the Chytridiaceae based on morphology. Without the molecular and ultrastructural studies known, is not possible the correct insertion of the taxon.



### Chytriomycetaceae

*Podochytrium chitinophilum* Willoughby, Transactions of the British Mycological Society 44(4): 590, 1961. Figs. 1G–I

Thallus eucarpic, monocentric, with a basal cyst and simple rhizoids. Zoosporangia epibiotic, pyriform,  $22.5\text{--}40 \times 12.5\text{--}30 \mu\text{m}$ , with a basal thickened wall, sterile basal cell, or both. Zoospores ovoid, spherical,  $5\text{--}7.5 \mu\text{m}$  diam., with a colourless lipid globule; discharge by a single apical or subapical pore. Resting spores not observed.

**Material examined:** Brazil, São Paulo State, Iguape, Mosaico de Unidade de Conservação Juréia Itatins, 28 Oct. 2017, from water samples, on shrimp exoskeleton. Leg. & det. A.L. Jesus and C.L.A. Pires-Zottarelli.

**Notes:** The morphological characteristics of our isolate are in agreement with the original description of Willoughby (1961).

*Rhizoclostratium globosum* H. E. Petersen, Journal de Botanique, 17: 216, 1903.

Figs. 1J–M

Thallus eucarpic, monocentric. Rhizoids extensive, delicate, branched. Zoosporangia subspherical or spherical,  $12.5\text{--}22 \mu\text{m}$  diam., occasionally with a clavate apophysis; wall slightly thickened, hyaline. Zoospores ovoid, spherical,  $2.5\text{--}4 \mu\text{m}$  diam., with a colourless globule. Resting spore subspherical,  $17\text{--}23 \times 14\text{--}21 \mu\text{m}$ , content evenly granular, with a smooth and faintly brown wall; germination through a pore in the wall and gives rise to a zoosporangium.

**Material examined:** Brazil, São Paulo State, Iguape, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia Itatins, 24 Aug. 2016, 13 Feb. 2017, 24 Jun. 2017 and 28 Oct. 2017, from samples of water, soil, submerged leaves, and surface sediments, on shrimp exoskeleton. Leg. & det. A.L. Jesus and C.L.A. Pires-Zottarelli. GenBank (CCIBt 4413): SSU = MN511696; ITS = MN509016; LSU = MN508395, (CCIBt4415): SSU = MN511697; ITS = MN509017; LSU = MN508396.

**Notes:** The morphological characteristics of our isolates are in agreement with the descriptions of Petersen (1903) and Sparrow (1960). Germination of the resting spore is documented here for the first time. Although this species was common in our samples, this is the first record of the genus and species for Brazil.

## Rhizophydiales

### Angulomycetaceae

*Angulomyces argentinensis* Letcher, Mycological Research 112(7): 776, 2008.

Figs. 1A–C

Thallus eucarpic, monocentric. Rhizoids branched, with one or two rhizoidal axes. Zoosporangia spherical, 8.5–12.5  $\mu\text{m}$  diam., with one to several discharge pores. Zoospores ovoid to spherical, 3–4  $\mu\text{m}$  diam., with a colourless lipid globule. Resting spores epibiotic or interbiotic, spherical 8–11  $\mu\text{m}$  diam., thick-walled, hyaline, with a single large lipid globule.

**Material examined:** Brazil, São Paulo State, Iguape, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia Itatins, 28 Oct. 2017, from soil samples, on pollen grains. Leg. & det. A.L. Jesus and C.L.A. Pires-Zottarelli. GenBank (ALJ54): SSU= MN511693; ITS = MN509013; LSU = MN508392.

**Notes:** The morphological characteristics of our isolate are in agreement with the original description of Letcher et al. (2008). The molecular similarity of our isolate with ex-type isolate (ARG08) are 86.6% (ITS) and 99.2% (LSU).

### Kappamycetaceae

*Kappamyces microporosus* A. L. Jesus & C. L. A. Pires-Zottarelli sp. nov. Fig. 2A–J

**Mycobank:** MB 835250

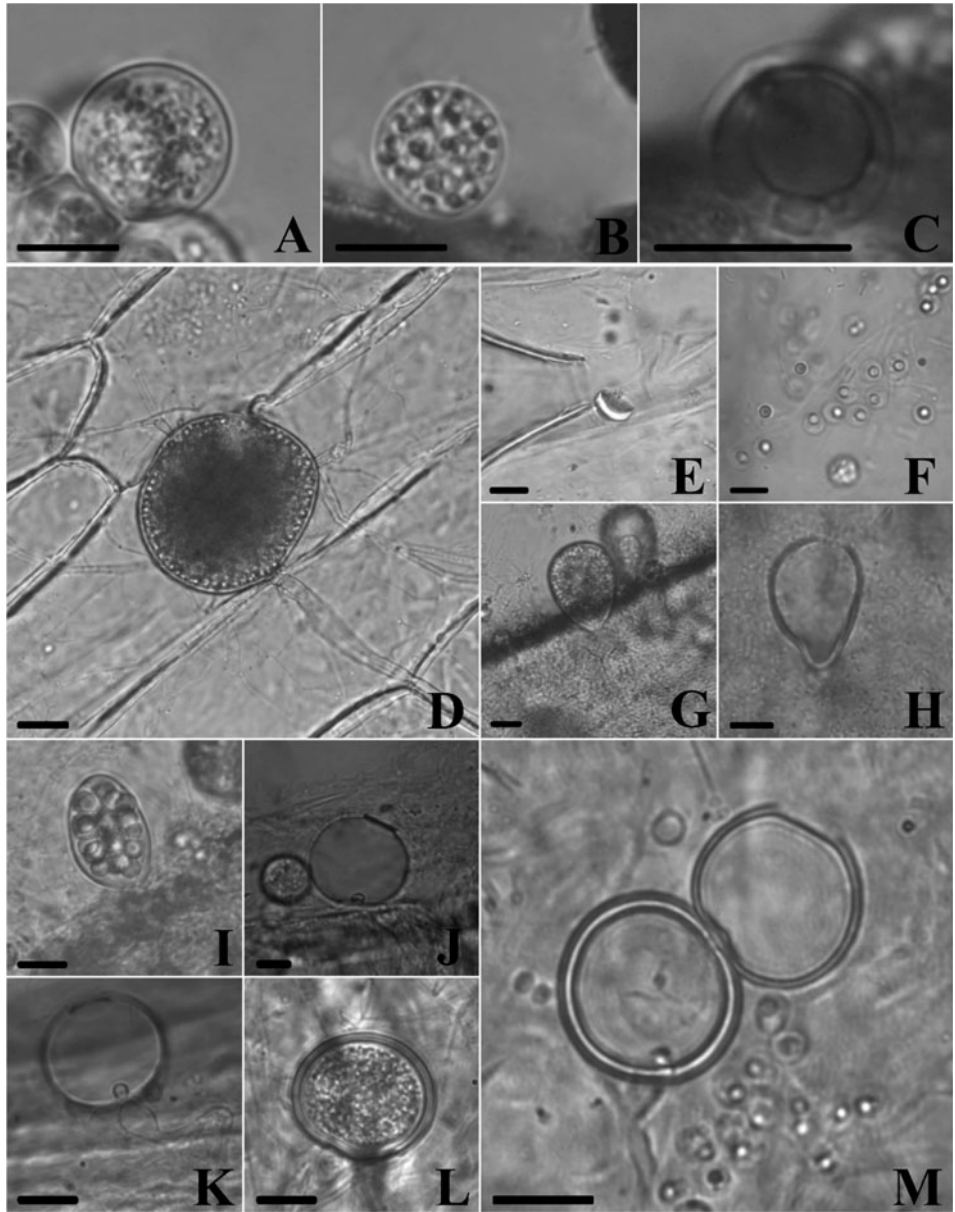
**Type:** Figure 2 A–J, diagnosis based on isolate CCIBt4548.

**Etymology:** *microporosus* refers to the presence of micropores in the zoosporangium.

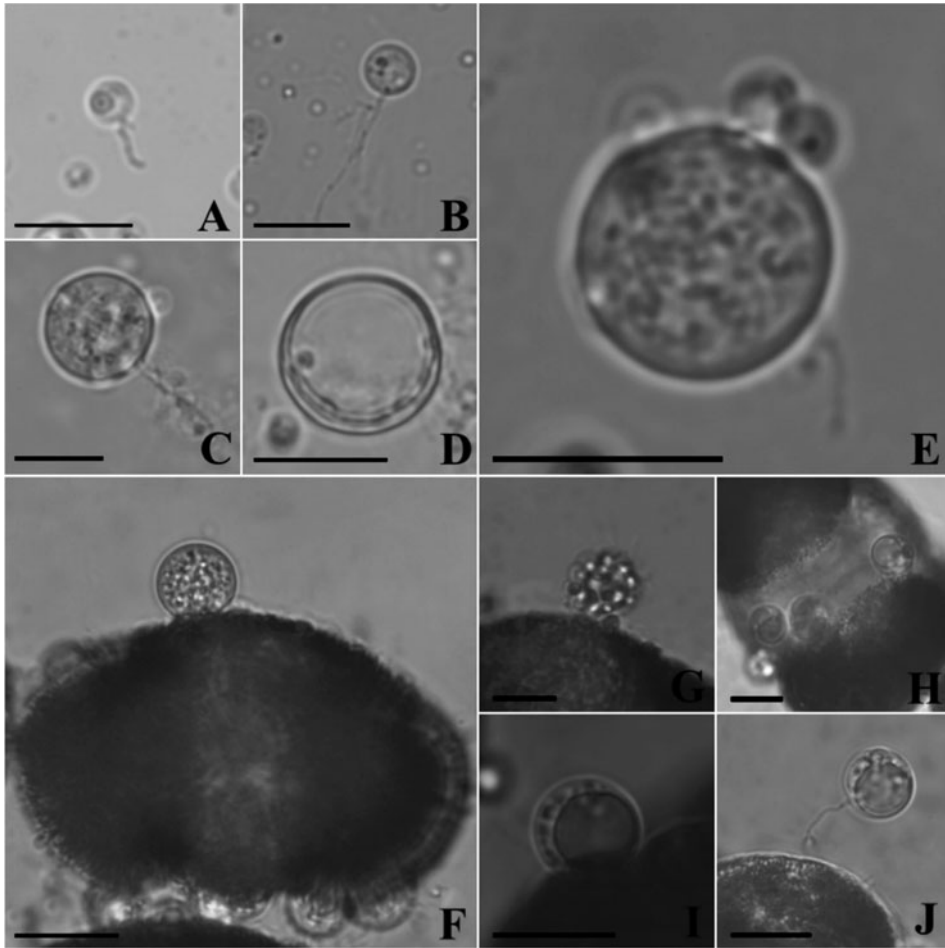
**Diagnosis:** Thallus eucarpic, monocentric, with simple rhizoids. Zoosporangia epibiotic, spherical, 8.75–15  $\mu\text{m}$  diam. on mPmTG, and 12.5–17.5  $\mu\text{m}$  diam. on pollen grains used as bait, with multiple micropores. Zoospores spherical, 3–4  $\mu\text{m}$  diam., with a colourless lipid globule; discharge by multiple micropores; many zoospores remained clustered directly in the pores of the zoosporangium after discharge. Resting spores epibiotic or interbiotic, sessile or stipitate, spherical, 10–12.5  $\mu\text{m}$  diam., hyaline, thick-walled, with a single large lipid globule; germination not observed.

**Material examined:** Brazil, São Paulo State, Peruíbe, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia Itatins, 24 Aug. 2016, from soil samples, on pollen grains. Leg. & det. A.L. Jesus and C.L.A. Pires-Zottarelli. GenBank (CCIBt 4548): SSU= MN511698; LSU = MN508397.

**Notes:** *Kappamyces microporosus* differs from *Kappamyces laurelensis* described by Letcher & Powell (2005) by having larger zoosporangia and multiple micropores in the



**Fig. 1.** **A–C.** *Angulomyces argentinensis*. **A.** Immature zoosporangia on mPmTG. **B.** Mature zoosporangium on pollen grain. **C.** Resting spore with a large lipid globule. **D–F.** *Karlingiomyces marylandicus*. **D.** Zoosporangium on onion skin. **E.** Operculum. **F.** Zoospores. **G–I.** *Podochytrium chitinophilum*. **G.** Immature zoosporangium with apophysis. **H.** Zoosporangium with a basal thickened wall. **I.** Mature zoosporangium on shrimp exoskeleton. **J–M.** *Rhizoclosmatium globosum*. **J.** Zoosporangia on shrimp exoskeleton. **K.** Zoosporangium with apophysis. **L.** Resting spore. **M.** Resting spore germination forming a zoosporangium externally. Bars = 10  $\mu$ m.

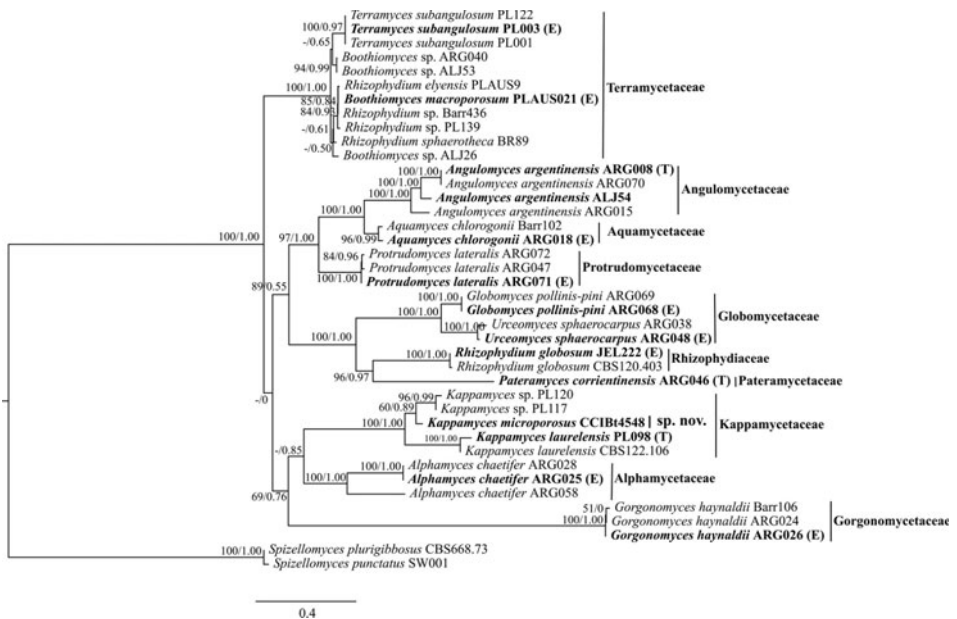


**Fig. 2. A–J.** *Kappamyces microporosus*. **A–E.** Development in mPmTG. **A–B.** Early thallus development. **C.** Immature zoosporangium. **D.** Empty zoosporangium after zoospore discharge. **E.** Mature zoosporangium with multiple micropores for zoospore discharge. **F–G.** Zoosporangia on a pollen grain. **H–I.** Resting spore on a pollen grain. **J.** Stipitate resting spore. Bars = 10  $\mu$ m.

zoosporangium for zoospore discharge. The micropores hamper the release of zoospores, and consequently, most of them encyst near the pores or on the same pollen grains shortly after discharge. The pores in the zoosporangial wall are not visible after zoospore discharge. The molecular similarity of our isolate with ex-type isolate of this genus (PL098) is 97.8% (LSU).

## Phylogenetic analysis

The ITS and LSU rDNA sequences of the isolates of Rhizophydiales obtained were compared with sequences of the ex-types and other isolates with high molecular similarity available in GenBank. Maximum likelihood analysis with bootstrap support and Bayesian inference values are shown in Fig. 3. *Angulomyces argentinensis* ALJ54 formed a highly supported clade (100 bs and 1.00 pp) together with other isolates of the species, being the only species described for this genus. *Kappamyces microporosus*, which is described here as a new species, is sister to the strains PL120 and PL117 and formed a monophyletic lineage with high support (100 bs and 1.00 pp) together with other isolates of the genus, among them, the type species *K. laurelensis*.



**Fig. 3.** Phylogram of Rhizophydiales inferred from Maximum likelihood analysis of combined ITS+ partial LSU rDNA sequence data. Maximum likelihood bootstrap support values <50% are indicated with (-). Bayesian posterior probability values >0.50 are labelled numerically. The clades that were not recovered in the Bayesian tree are indicated with (O). The scale bar indicates the average number of substitutions per site. Sequences from this study, types (T) and epitypes (E) are indicated in bold-face.

## Discussion

The cellulosic *Karlingiomyces marylandicus* and the chitinophilic *Rhizoclostridium globosum* were the most frequently found species in our samples. Both commonly are reported from aquatic and terrestrial ecosystems in other countries (Sparrow 1960, Karling 1977, Powell & Letcher 2014). The type for *Karlingiomyces* is the chitinophilic *K. asterozystis*, which is a member of the Polychytriales. Although *K. marylandicus* has not been removed from *Karlingiomyces*, Longcore and Simmons (2012) suggested that cellulosic species not should be accepted in the genus without molecular or transmission electron microscope evidence.

Our morphological and phylogenetic analyses of Rhizophydiales evidenced the differentiation between some genera and species of this order. The new species *Kappamyces microporosus* is the second species described in this genus. Currently, the Kappamycetaceae (Letcher et al. 2006) contains *Kappamyces laurelensis*, *K. microporosus*, and two strains (PL120 and PL117) that lack morphological description. Certainly, many species of chytrids will be described in the future. We believe that it is important to consider the morphological plasticity and the whole life cycle within this fungal group, as pointed out by Powell et al. (2018).

In Brazil, several studies documenting members of the Chytridiomycota have been published (Pires-Zottarelli et al. 1996, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009, Jesus et al. 2013, Jerônimo et al. 2015), however, the number of known taxa is still limited. This inventory, with morphological and molecular data, is an important contribution to the knowledge of diversity of this group of microorganisms in Brazil, as well as for science, providing detailed descriptions of a new species and new records coming from unexplored areas of the country.

## Acknowledgments

We are indebted to “Instituto Florestal” for permission given to collect samples at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” and Otto Hartung for his valuable help during sampling. We also wish to thank São Paulo Research Foundation – FAPESP for the fellowships given to A.L. Jesus (Process N°. 2016/00697-0) and for the financial support given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N°. 2016/11146-4). CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is also acknowledged for the grant given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N° 304091/2018-9) and CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”) for the financial support given to A.L. Jesus through the post-graduation program.

## References

- Barr, D.J.S. (2001): Chytridiomycota. – In: Esser, K. & Lemke, P.A. (Eds.): The Mycota VII, Part A: Systematics and Evolution: 93–112. Springer-Verlag, Berlin.
- Fundação Florestal (2014): Estação Ecológica da Juréia Itatins. Sobre a Estação Ecológica. Available from: <https://www.ambiente.sp.gov.br/e-e-jureia-itatins/sobre-a-estacao>.
- Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95–98.
- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Marano, A.V., James, T.Y., Souza, J.I., Rocha, S.C.O., Pires-Zottarelli, C.L.A. (2015): Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP. Brasil. – Hoehnea 42: 135–163.
- Jesus, A.L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H., Pires-Zottarelli, C.L.A. (2013): Diversidade de organismos zoospóricos do córrego Pirarungaua, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil: novas citações. – Hoehnea 40: 167–180.
- Karling, J.S. (1949): New monocentric eucarpic operculate chytrids from Maryland. – Mycologia 41: 505–522.
- Karling, J.S. (1977): Chytridiomycetorum Iconographia. – Monticello, New York: Lubrecht-Cramer.
- Kazutaka, K. & Daron, M. (2013): MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. – Available from: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J. (2005): *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). – Nova Hedwigia 80: 115–133.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J. (2014): Hypothesized evolutionary trends in zoospore ultrastructural characters in Chytridiales (Chytridiomycota). – Mycologia 106: 379–396.
- Letcher, P.M., Powell, M.J. & Davis, W.J. (2018): Morphology, zoospore ultrastructure, and molecular position of taxa in the *Asterophlyctis* lineage (Chytridiales, Chytridiomycota). – Fungal Biol. 122: 1109–1123.
- Letcher, P.M., Powell, M.J., Churchill, P.F. & Chambers, J.G. (2006): Ultrastructural and molecular delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). – Mycol. Res. 110: 898–915.
- Letcher, P.M., Vélez, C.G., Barrantes, M.E., Powell, M.J., Churchill, P.F., Wakefield, W.S. (2008): Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. – Mycol. Res. 112: 759–782.
- Longcore, J.E. & Simmons, D.R. (2012): The Polychytriales ord. nov. contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. – Mycologia 104: 276–294.
- Marano, A.V., Jesus, A.L., de Souza, J.I., Leão, E.M., James, T.Y. et al. (2014): A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). – Mycosphere 5: 510–522.
- Milanez, A.I. (1989): Fungos de águas continentais. – In: Fidalgo, O. & Bononi, V.L. (coords.): Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico; p. 17–20. São Paulo, Brasil.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2009): Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, SP. – Acta Botanica Brasilica 23: 459–473.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2012): Diversidade de fungos zoospóricos da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, Brasil. – Rodriguésia 63: 587–611.
- Petersen, H.E. (1903): Note sur les Phycomycètes observés dans les téguments vides des nymphes de Phryganées, avec description de tris espèces nouvelles de Chytridinées. – J. de Botanique 17: 216–222.

- Pires-Zottarelli, C.L.A., Milanez, A.I., Schoenlein-Crusius, I.H. & Lohmann, L.G. (1996): Crip-tógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 6: Chytridiales. – *Hoehnea* 23: 77–90.
- Posada, D. (2008): jModelTest: phylogenetic model averaging. – *Mol. Biol. Evol.* 2: 1253–1256.
- Powell, M.J. (1993): Looking at mycology with a Janus face: a glimpse of Chytridiomycetes active in the environment. – *Mycologia* 85: 1–20.
- Powell, M.J. & Letcher, P.M. (2014): Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota. – In: McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (eds.): *The Mycota VII, Part A: Systematics and Evolution*: 141–175. Springer-Verlag, Berlin.
- Powell, M.J., Letcher, P.M. & Chen, S.F. (2018): Phylogeny and taxonomic revision of the soil chytrid, *Gaertneriomyces*, and description of the new genus *Barromyces* (Spizellomycetaceae, Chytridiomycota). – *Nova Hedwigia* 107: 205–228.
- Rocha, M. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2002): Chytridiomycota e Oomycota da Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. – *Acta Botanica Brasílica* 16: 287–309.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A. et al. (2012): MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across large model space. – *Systematic Biol.* 61: 539–542.
- Schmitz, A. & Riesner, D. (2006): Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. – *Anal. Bioche.* 354: 311–313.
- Seto, K. & Degawa, Y. (2018): *Pendulichytrium sphaericum* gen. et sp. nov. (Chytridiales, Chytriomycetaceae), a new chytrid parasitic on the diatom, *Aulacoseira granulata*. – *Mycoscience* 59: 59–66.
- Souza, C.R.G & Souza, A.P. (2004): Geologia e Geomorfologia da área da Estação Ecológica Juréia-Itatins. – In: Maruque, O.A.V. & Duleba, W. (eds.): *Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna*, p. 16–33. Holos, Ribeirão Preto.
- Sparrow, F.K. (1960): *Aquatic Phycomycetes*. – 2nd ed., University of Michigan Press, Michigan.
- Stamatakis, A. (2014): RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. – *Bioinformatics* 30 (9): 1312–1313.
- Tarifa, J.R. (2004): Unidades Climáticas dos Maciços Litorâneos da Juréia-Itatins. – In: Maruque, O.A.V. & Duleba, W. (eds.): *Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna*, p. 42–50. Holos, Ribeirão Preto.
- Vaidya, G., Lohman, D.J. & Meier, R. (2010): SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. – *Cladistics* 27: 171–180.
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. – *J. Bacteriol.* 172: 4238–4246.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.): *PCR protocols: A guide to the methods and applications*, p. 315–322. Academic Press, New York.
- Willoughby, L.G. (1961): Chitinophilic chytrids from lake muds. – *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 44: 586–592.

Manuscript received: January 28, 2020

Accepted: April 8, 2020

Responsible editor: J. Blaszowski



# **CAPÍTULO III**

(Artigo submetido à revista Mycologia)

Short title: **New taxa of Chytriomycetaceae**

Title: **Two new species of Chytriomycetaceae (Chytridiales, Chytridiomycota): morphological, phylogenetical and ultrastructural characterization**

Ana L. Jesus<sup>a\*</sup>, Gustavo H. Jerônimo<sup>a</sup> and Carmen L. A. Pires-Zottarelli<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, São Paulo, SP, Brazil*

\*Corresponding author: analuciajesus@hotmail.com

**ABSTRACT:** In the last decades, the systematics of Chytridiales has been deeply influenced by analyses of molecular markers and zoospore ultrastructure from its representatives. Even the Chytridiales is the largest order within Chytridiomycota, Brazilian isolates of this clade have not yet been included in these analyses. In order to contribute to the knowledge of Chytridiales in Brazil, we isolated and analysed the morphology and phylogenetic position based on the SSU, 5.8S and LSU rDNA regions of seven species. Our concatenate phylogram evidenced five lineages that fit within the Asterophlyctaceae, Chytriomycetaceae and Chytridiaceae, and two *incertae sedis* lineages. Based on the obtained results, we described two new species of Chytriomycetaceae, *Rhizidium crepaturum* and *Siphonaria aurea*, and recorded *Rodmanochytrium sphaericum* M. J. Powell and Letcher for the first time in Brazil.

**KEY WORDS:** flagellar plug, 2 new taxa, paracrystalline inclusion, taxonomy, zoospore ultrastructure

## **INTRODUCTION**

In the last decades, the systematics of Chytridiales has been deeply influenced by molecular markers and zoospore ultrastructure from its representatives. Consequently,

new hypotheses and evolutionary trends within this order have been proposed (James et al. 2000, Barr et al. 2001, James et al. 2006, Hibbert et al. 2007, Powell and Letcher 2014, Tedersoo et al. 2018).

Most of the Chytridiomycota diversity lies in the Chytridiales. This was the first order described and has been subjected to pronounced changes in the last years.

Initially, all members of this order were included in one family, the Chytridiaceae (Nowakowski 1878), and posteriorly segregated into three families (Asterophlyctaceae, Chytridiaceae and Chytriomycetaceae) and two *incertae sedis* lineages (Letcher and Power 2014, Seto and Degawa 2018, Letcher et al. 2018), based on molecular data and zoospore ultrastructure.

Letcher and Powell (2014) reported multiples states for almost all characters that define the zoospores of Chytridiales. These authors hypothesized the correlation between zoospore ultrastructural complexity and molecular phylogeny and showed a trend of complexity reduction throughout evolution in the most derived taxa. Posteriorly, Letcher and Powell (2018) and Seto and Degawa (2018) described intermediary zoospores configurations that did not fit in the zoospore types defined by Letcher and Powell (2014).

In Brazil, several studies have reported the presence of Chytridiales (e.g. Pires-Zottarelli et al. 1996, Rocha and Pires-Zottarelli 2002, Nascimento and Pires-Zottarelli 2009, Nascimento and Pires-Zottarelli 2012, Jesus et al. 2013, Jerônimo et al. 2015, Jesus and Pires-Zottarelli 2020), however, most studies on systematics were carried out with North American isolates (Letcher and Powell 2005, Davis et al. 2015, Letcher et al. 2018, Powell et al. 2018, Powell et al. 2019 among others), and only a few included South American strains (Letcher et al. 2008, Velez et al. 2011 and Velez et al. 2013).

Jerônimo et al. (2019a and b) carried out the first studies that analysed the phylogenetic placement and zoospore ultrastructure of Brazilian species of Chytridiomycota, however, these studies did not include any representatives of Chytridiales. In order to contribute to the diversity and systematics of Chytridiales, we isolated 14 specimens, related to seven taxa, and described two new species and a new record to Brazil, based on molecular markers of rDNA (SSU, ITS and LSU) and/or zoospore ultrastructure.

## MATERIALS AND METHODS

*Isolation and culture.* —Samples of soil and water, submerged leaves and surface sediments were collected from freshwater bodies at several areas of Brazilian Atlantic Rainforest (Table 1). In the laboratory, these samples were processed according to the methodology described by Milanez (1989) and baited with different substrates (onion skin, corn leaves, shrimp exoskeleton, snakeskin, cellophane and pollen grains). Gross cultures were incubated for 7–30 days at 21°C, and purified by the addition of new baits and/or onto solid mPmTG culture medium (0.4 g peptonized milk, 0.4 g tryptone, 2.5 g glucose, 13 g agar and 1L distilled water, 0.1 g streptomycin sulfate, and 0.1 g penicillin-G).

*Morphological studies.* —The morphology and development of the isolates on the baits and in pure culture were observed under a Leica DMLB2 compound microscope and documented with a Leica MC170 HD camera using Leica Qwin 3.1 software (Hessen, Wetzlar, Germany). The specimens were identified using specific literature (Sparrow 1960; Karling 1977) and original descriptions of the species. Isolates in pure culture and voucher specimens were deposited in the CCIBt Culture Collection (*Coleção de*

*Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias* do Instituto de Botânica), and in the Herbarium SP, respectively (Table 1).

*DNA extraction, amplification and sequencing.* — The biomass for DNA extraction was obtained through cultivation in liquid medium (25 mL of liquid mPmTG) or on baits. After incubation for 15-21 days at 22 C, the biomass produced in culture medium, or the colonized baits were centrifuged at 13000 rpm for 15 min to obtain pellets. Thereafter, the pellets were washed with sterile distilled water and the DNA was extracted according to the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). The parcial LSU and SSU regions and the complete ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) were amplified using the primers LR0R/LR5, SR1R/NS4 (Vilgalys and Hester 1990) and ITS4/ITS5, respectively (White et al. 1990). The PCR amplification followed the parameters described in Marano et al. (2014). Amplicons were purified using the protocol described in Schmitz and Riesner (2006). Sequencing was performed in an ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies TM).

*Phylogenetic analyses.* — We created a single (concatenate) dataset with the 5.8S, LSU and SSU nuc rDNA sequences of 56 isolates of Chytridiales and other sequences obtained from GenBank, using *Boothiomycetes elyensis* PLAUS 09 and *Boothiomycetes macroporosum* PLAUS 021 as outgroups (Table 2). The sequences were aligned using MAFFT 7, with default settings (Kato et al. 2017), and adjusted manually in BioEdit (Hall 1999). The best fitting model of evolution was selected using the Akaike Information Criterion in jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). The dataset was concatenated using SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al. 2010), resulting in a final length of 2229 bp. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) phylogenies were constructed using RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) and MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) run through the CIPRES Science Gateway platform (<https://www.phylo.org/>). We

performed the ML analysis with 1000 bootstrap (bs) replicates using the GTRGAMMAI model. The BI used the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methodology to calculate posterior probabilities (pp). The program was run for five million generations and the first 10% of the iterations were discarded as burn-in and sampled every 1000<sup>th</sup> iterations from the remainder.

*Zoospore ultrastructural analysis.* — For transmission electronic microscopy (TEM), the zoospores were fixed according to the protocol described in Jerônimo et al. (2019b). Thirty plates with solid mPmTG culture medium were inoculated with each target chytrid's thallus. After 3-5 days of incubation, the growth and zoospore production were checked. Each plate was flooded with 1-2 mL of sterile deionized water. Zoospore discharge occurred 30-60 min after plate flooding. The zoospores were collected and fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M s-collidine buffer, and maintained for 18-24 h at 4 C. Fixed zoospores were centrifuged at 3G for 30 min to obtain zoospore pellets, washed three times without resuspension with 0.05 M s-collidine buffer, and posteriorly fixed in 1% osmium tetroxide for 30 min. After fixation, the pellets were washed with 0.05 M s-collidine buffer and sterile deionized water. Then, the zoospores were embedded in 2% noble agar and cuted in blocks. The blocks were washed with 10% acetone for 10 min and fixed in 2% uranyl acetate at 4 C for 12 h. After this period, the blocks were dehydrated in a graded acetone series (10%, 30%, 50%, 75%, 95% for 10 min and 100% twice for 10 min) and embedded in EPOX 812. Thereafter, the blocks were cuted with a diamond knife using a Leica Ultracut UCT Ultramicrotome and the sections collected on nickel grids. Sections were post-stained for 10 min in 70% etanol, followed by 10 min in lead citrate. Finally, the sections were examined with a JEOL JEM-1010 at the “Faculdade de Medicina of the Universidade de São Paulo-FMUSP/HC”.

## RESULTS

We identified 14 specimens of Chytridiales, which are distributed among the genera *Chytriomycetes*, *Cladochytrium*, *Entophlyctis*, *Rhizidium*, *Rhizoclosmatium*, *Rodmanochytrium* and *Siphonaria*, including two new species. All strains except *Cladochytrium tenue* shared the morphological characteristics of Chytriomycetaceae family. Our isolates of *Cladochytrium tenue* were included in the phylogenetic analyses because they are morphologically similar to *Zopfochytrium*, a recently described genus in Chytridiales whose thallus morphology resembles members of the Cladochytriales. Since *C. tenue* is the type species of the genus *Cladochytrium*, further and detailed analyses and particularly the characterization of the zoospore ultrastructure is needed before formally transferring this species to Chytridiales.

*Phylogenetic analyses.* —Maximum likelihood and Bayesian inference analyses showed three major clades, representing Asterophlyctaceae, Chytriomycetaceae and Chytridiaceae (Fig. 1). Our isolates clustered within Chytriomycetaceae with high support. The isolate SP512582 is described herein as a new species named *Rhizidium crepaturum*, based on its morphological characteristics and phylogenetic placement in a highly supported clade (84 bs and 0.99 pp) with *R. phycophilum*, which was described by Picard et al. (2009) and is the only species-level sequence available in public databases. In addition, isolates CCIBt3846, CCIBt4124 and CCIBt4685 formed a highly supported and segregated branch within *Siphonaria*, and also represents a new species named herein *Siphonaria aurea*, which is closely related to *S. petersenii* JEL102 and *Siphonaria* sp. JEL065.

*Rodmanochytrium sphaericum*, which was recently described by Powell et al. (2019) and is closely related to *Chytriomycetes hyalinus*, represents a new record for Brazil.

*Morphology.* —*Rhizidium crepaturum* produces spherical zoospores with a single and hyaline lipid globule (Fig. 2A). At maturity, the rhizoidal system has a long and slightly branched axis (Fig. 2B-C). Zoospores are discharged as a mass through a break in the wall of the mature zoosporangium (Fig. 2D). Resting spores are yellowish and have a long rhizoidal axis (Fig. 2E-F). At maturity, the wall of the resting spore breaks and germinates to form a hyaline and sessile zoosporangium (Fig. 2G), which posteriorly discharge the zoospores through a break in the zoosporangial wall (Fig. 2H-J).

*Siphonaria aurea* produces spherical zoospores with two lipid globules: a small golden red and a large hyaline globule (Fig. 3A-B). After encystment, the golden red lipid globule is not clearly visible, and the young zoosporangia have a hyaline aspect (Fig. 3C-F). As development progresses, the zoosporangium becomes slightly orange (Fig. 3G) and develop into a strongly golden red at mature stages (Fig 3H-J). The zoospores are discharged as a globular mass (Fig. 3K-L), with resting spores not observed.

*Rodmanochytrium sphaericum* produces zoospores with a single hyaline lipid globule (Fig. 4A). In the early development stages, the zoospores have a short and branched rhizoidal axis (Fig. 4B-F). The mature zoosporangia have an apical or subapical operculum (Fig. 4G-J). Resting spores not observed.

## TAXONOMY

*Rhizidium crepaturum* A.L. Jesus, G.H. Jerônimo & C.L.A. Pires-Zottarelli sp. nov.

FIG. 2A-J



MycoBank: [XXXX](#)

*Typification:* BRAZIL, SÃO PAULO: Iguape, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, 24°32'39.5"S, 47°29'22.1"W, from soil samples baited with shrimp exoskeleton and snakeskin. **Holotype** (FIG. 2A-J). Diagnosis based on SP512582. GenBank: SSU: MT406246; ITS: MT410718; LSU: MT406236

*Etymology:* from *crepaturum* (Latin): referring to the breakage of the resting spore's wall.

Fungus saprotrophic with monocentric and epibiotic thallus. Rhizoidal system with a single and long axis, few branches at its extremities. Zoosporangia smooth, hyaline, spherical, 15–45 µm diam, non-apophysate. Zoospores spherical, 5–6.25 µm diam., with a single hyaline lipid globule; zoospores discharged in a vesicle through a break in the zoosporangial wall. Resting spore spherical, 17–46 µm diam., wall thick, yellowish or brown, which germinates by producing a zoosporangium completely free from the wall of resting spore. The zoosporangium germinates by the complete breakage of the resting spore wall.

*Notes:* *Rhizidium crepaturum* differs from other species of the genus by the absence of a discharge pore in the zoosporangium. Instead, the zoospores in this species are discharged through a break in the zoosporangial wall. The resting spore is also unusual since it germinates by producing a mature and hyaline zoosporangium through the complete breakage of its wall.

***Siphonaria aurea*** G.H. Jerônimo, A.L. Jesus & C.L.A. Pires-Zottarelli sp. nov.

FIG. 3A-L

MycoBank: [XXXXXX](#)

*Typification:* BRAZIL, SÃO PAULO: “Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virginia”, 23°20'44.1"S, 45°08'45.0"W, from soil samples baited with

shrimp exoskeleton and snakeskin. **Holotype** (FIG. 3A-L). Diagnosis based on CCIBt 4685. **Ex-type** CCIBt4685. GenBank: SSU: MT406247; ITS: MT410719; LSU: MT406237.

Other materials examined: BRAZIL. SÃO PAULO. “Parque Estadual das Fontes do Ipiranga” (23°38'18.8"S, 46°37'31.7"W), from soil samples baited with shrimp exoskeleton, 12 Aug 2011. CCIBt3846. GenBank: ITS: MT410721; LSU: MT406239. BRAZIL. IPERÓ. Hedberg reservoir (23°25'55.8"S, 47°35'33.1"W), from surface sediment samples baited with shrimp exoskeleton, 03 Aug 2016. CCIBt4124. GenBank: SSU: MT406248; ITS: MT410720; LSU: MT406238.

*Etymology*: from *aurea* (Latin), referring to the color of the zoospore lipid globule.

Fungus saprotrophic. Thallus monocentric and epibiotic. Rhizoidal system with a single and long axis. Zoosporangia usually apophysate, smooth, inoperculate, spherical, 12.5–35 µm diam., with a dark low apical or subapical exit papilla. Zoospores with two lipid globules, oval 6–5 × 4.5–4.5 µm or spherical 4.5–6 µm diam., with a posterior flagellum; golden red globule 0.75–1 µm diam. and hyaline globule 1–2.5 µm diam. Zoospore discharge in a vesicle outside the zoosporangium. Resting spores not observed.

*Notes*: *Siphonaria aurea* differs from other species of this genus by the production of zoospores with two lipid globules of different color and the size of the zoosporangium, which is bigger in this species. Many efforts were made to stimulate the production of sexual resting spores without success, suggesting that sexual reproduction can be absent in *S. aurea*. *Siphonaria aurea* is morphologically similar to *Chytriomycetes aureus* Karling, which also has zoospores with two different lipid globules (Karling 1945). This similarity is even more evident when we compare the size and color of the

zoospores, the rhizoid insertion and the zoosporangium size. *Chytrium aureus* was originally described in Brazil as saprophyte on mayfly exuviae and other chitin substrates (Karling 1945) and is commonly reported as saprotrophic in several regions of the country. The most prominent difference between both species is the presence of an operculum in *Chytrium aureus* and a pore in *S. aurea*. However, the pore morphology of *S. aurea* is strikingly similar to an operculum and has a darkened prominence (Fig. 3H-I), which might lead to misidentification, because it can be distinguished from the later only during zoospore discharge.

***Rodmanochytrium sphaericum*** M.J. Powell & Letcher

FIG. 4A-K

Fungus saprotrophic. Thallus monocentric and eucarpic. Rhizoidal system endobiotic, arising from the tip of the germ tube, extensive, fine-branched. Zoosporangium spherical, 27.5–57.5 µm diam. or subspherical, 22.5–55 × 23.75–60 µm. Zoospore discharge from a single operculum, apical or subapical, 7.5–16.5 µm diam. Zoospores elongate, 4.5–5.5 µm long, with a single hyaline lipid globule. Resting spore not observed.

*Specimens examined:* BRAZIL, SÃO PAULO: Iguape, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, 24°34'18.5" S, 47°26'41.5" W, from a water sample baited with shrimp exoskeleton. Diagnosis based on CCIBt4546. GenBank (CCIBt4546): SSU: MT406245; ITS: MT410717; LSU: MT406235.

*Notes:* the morphological characteristics of our isolates are in agreement with the original description of Powell et al. (2019).

*Zoospore ultrastructure.* —The zoospores of *Siphonaria aurea* CCIBt4685 have ultrastructural features typical of Chytriomycetaceae. The lipid globule is covered by a microbody (Fig. 5D) and a fenestrated cisterna (Fig. 5E-F), located laterally, near the flagellar apparatus; ribosomes aggregated in the center of zoospore and enclosed by the endoplasmic reticulum; nucleus and mitochondria located outside the ribosomal aggregation (Fig. 5A-B). Peripheral cytoplasm with a single paracrystalline inclusion and several vacuoles (Fig. 5C). Kinetosome and nonflagellated centriole parallel and connected by a fibrillar bridge (Fig. 5G-H). Flagellar plug narrow, biconcave and one-layered (Fig. 5I). Microtubular root and kinetosome-associated structure (KAS) not observed. A schematic draw is shown in Figure 6.

## DISCUSSION

*Phylogenetic analyses.* — Our results showed that the Brazilian Chytridiomycetaceae specimens are closely related to those from Argentina and North America, reinforcing the theory that most chytrid species have a cosmopolitan distribution in aquatic and terrestrial ecosystems (Vélez et al. 2013). Besides including new taxa in our phylogenetic analyses, we also included sequences of *Entophlyctis luteolus*, *Rhizoclostridium globosum* and *Chytromyces hyalinus*, which were also related to North American and Argentinean strains.

*Morphology.* — The morphological characters of Chytridiales have multiple and variable states. As mentioned by Velez et al. (2013) and Powell and Letcher (2014), studies focusing only on classical morphology are suggestive of errors, and the association with phylogeny and zoospore ultrastructure is mandatory.

*Rhizidium crepaturum* has structures morphologically similar to other *Rhizidium* species, such as rhizoids with a main long axis and an inoperculate zoosporangium.

However, it differs from other species of this genus by the absence of a discharge pore in the zoosporangium. Its resting spore has unique characteristics, such as a thick, smooth, yellowish or brown wall that germinates by breaking the wall to produce a mature zoosporangium. This resembles the resting spores of some Blastocladiomycota species, in which an endosporangium protrudes outward during germination (James et al. 2006). Similarly, *Myiophagus*, a member of Chytridiales, produces an embedded zoosporangium by the germination of the resting spore, as reported by Sparrow (1939).

*Siphonaria aurea* shares some morphological similarities with the type-species of the genus, *Siphonaria variabilis* Sparrow, such as the presence of orange zoosporangia with a single papilla. However, in *S. variabilis* the papilla is clearly visible as one of the first-formed structures in the young thallus (Sparrow 1937), while in *S. aurea* this structure is visible only in the mature thallus. Furthermore, the basal position of the discharge pore observed in *S. variabilis* is unique within the genus and seems to be a key and invariable feature since it was used by Sparrow (1960) to separate this species from other *Siphonaria* species. In our study, *S. aurea* did not produce sexual resting spores, as documented for the other three species of this genus. It is interesting to mention the zoosporangial similarity between *S. aurea* and *Chytriomycetes aureus*, although *S. aurea* produces a pore and *C. aureus* an operculum for zoospore discharge. In the mature thallus of *S. aurea*, the pore wall become thick and dark (FIG 3H-I) and is visually like an operculum. Willoughby (1959) reported that the operculum of *C. aureus* is inconspicuous and rarely seen after zoospore discharge, besides this, the author commented the disappearance and the reappearance of the golden red lipid globule after the encystment of the zoospores in medium culture, like as verified to *S. aurea* (Fig. 3C-F).

*Rodmanochytrium sphaericum* shares morphological similarities with *Chytriomycetes hyalinus* and thus phylogenetic data were essential for identification. *Zoospore ultrastructure.* — The zoospore ultrastructure of *Siphonaria aurea* fits in Group I-type zoospore described for Chytriomycetaceae, with regard to the nucleus position (Vélez et al. 2011), however, no evidence of microtubules and kinetosome associated structure was observed, as described for *S. variabilis* (Letcher and Powell 2014). The nucleus outside the ribosomal aggregation in *Siphonaria aurea* confirms the evolutionary trend in Chytridiales proposed by Letcher and Powell (2014), with regard to the nucleus position, which in the most basal clades is located outside of the ribosomal aggregation.

In this study, we described two new species of Chytriomycetaceae for the tropics and revealed the zoospore ultrastructure of *Siphonaria aurea*, contributing to Chytridiales systematics and increasing our knowledge about the diversity and evolution of these chytrids.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are indebted to “Instituto Florestal” for the permission given to collect samples at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” and Otto Hartung for his valuable help during sampling. We appreciate the collaboration of Dr. Peter M. Letcher and Dr. Martha J. Powell (The University of Alabama) for TEM support. We also wish to thank São Paulo Research Foundation – FAPESP for the fellowships given to A.L. Jesus (Process N°. 2016/00697-0) and to G.H. Jerônimo (Process 2014/16358-4), and for the financial support given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N°. 2016/11146-4). CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is also

acknowledged for the grant given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N° 304091/2018-9) and CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”) for the financial support given to A.L. Jesus through the post-graduation program.

## **LITERATURE CITED**

Barr DJS. 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canad. J. Bot.* 58:2380–2394.

Barr DJS. 2001. Chytridiomycota. In: Esser K, Lemke PA. eds. *The Mycota VII, Part A: Systematics and Evolution*. Berlin: Springer-Verlag. p 93–112.

Davis WJ, Letcher PM, Longcore JE, Powell MJ. 2015. *Fayochytriomyces*, a new genus within Chytridiales. *Mycologia* 107(2):432–439.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95–98.

Hibbett D, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111: 509–547.

James TY, Porter D, Leander CA, Vilgalys R, Longcore JE. 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Can J Bot* 78: 1–15.

James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R. 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98:860–871.

Jerônimo GH, Jesus AL, Marano AV, James TY, de Souza JI, Rocha SCO, Pires-Zottarelli CLA. 2015. Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Brasil. *Hoehnea* 42:135–163

Jerônimo GH, Jesus AL, Simmons DR, James TY, Pires-Zottarelli CLA. 2019a. Novel taxa in Cladochytriales (Chytridiomycota): *Karlingiella* (gen. nov.) and *Nowakowskiella crenulata* (sp. nov.). *Mycologia* 111(3):506–516.

Jerônimo GH, Simmons DR, James TY, Pires-Zottarelli CLA. 2019b. *Boothiomyces angulosus* and *Boothiomyces elyensis*: two new combinations in the Terramycetaceae (Rhizophydiales, Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* 109(4):399–412.



Jesus AL, Marano AV, Schoenlein-Crusius IH, Pires-Zottarelli CLA. 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40:167–180.

Jesus AL, Pires-Zottarelli CLA. 2020. Chytridiales and Rhizophydiales (Chytridiomycota): new species and new records for Brazil. *Nova Hedwigia* 110(2):293–305.

Karling JS. 1945. Brazillian Chytrids. VI. *Rhopalophlyctis* and *Chytriomycetes*, two new chitinophyllic operculate genera. *Amer. J. Bot.* 32:362–369.

Karling JS. 1977. *Chytridiomycetarum Iconographia*. Monticello, New York: Lubrecht-Cramer. 414 p.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* bbx 108: 1–7.

Letcher PM, Powell MJ. 2005. Phylogenetic position of *Phlyctochytrium planicorne* (Chytridiales, Chytridiomycota) based on zoospore ultrastructure and partial nuclear LSU rRNA gene sequence analysis. *Nova Hedwigia* 80:135–146.

Letcher PM, Powell MJ. 2014. Hypothesized evolutionary trends in zoospore ultrastructural characters in Chytridiales (Chytridiomycota). *Mycologia* 106:379–396.

Letcher PM, Vélez CG, Barrantes ME, Powell MJ, Churchill PF, Wakefield WS. 2008. Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. *Mycol. Res.* 112: 759–782.

Letcher PM, Powell MJ, Davis WJ. 2018. Morphology, zoospore ultrastructure, and molecular position of taxa in the *Asterophlyctis* lineage (Chytridiales, Chytridiomycota). *Fungal Biol.* 122: 1109–1123.

Marano AV, Jesus AL, de Souza JI, Leão EM, James TY, Jerônimo GH, de Cock AWAM, Pires-Zottarelli CLA. 2014. A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5:510–522.

Milanez AI. 1989. Fungos de águas continentais. In: Fidalgo O, Bononi VL (coords) Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série documentos, São Paulo, Brasil, pp. 17–20.

Nascimento CA, Pires-Zottarelli CLA. 2009. Chytriales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23:459–473.

Nascimento CA, Pires-Zottarelli CLA. 2012. Diversidade de fungos zoospóricos da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, estado de São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* 63:587–611.

Nowakowski L. 1878. Przyczynek do morfologii i systematyki Skoczkow (Chytridiaceae). *Akad. Umiejetnosci Krakowie. Wydział mat.-przyród. Pamiętnik* 4:174–198.

Picard KT, Letcher PM, Powell MJ. 2009. *Rhizidium phycophilum*, a new species in Chytridiales. *Mycologia* 101:696–706.

Pires-Zottarelli CLA, Gomes AL. 2007. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* 7:309–329.

Pires-Zottarelli CLA, Milanez AI, Schoenlein-Crusius IH, Lohmann LG. 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 6: Chytridiales. *Hoehnea* 23:77–90.

Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2:1253–1256.

Powell MJ, Letcher PM. 2014. Chytridiomycota, Monoblepharidomycota and Neocallimastigomycota. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW, eds. *The Mycota VII, Part A: Systematics and Evolution*. Berlin: Springer-Verlag. p. 141–175.

Powell MJ, Letcher PM, Longcore JE, Blackwell WH. 2018. *Zopfochytrium* is a new genus in the Chytridiales with distinct zoospore ultrastructure. *Fungal Biology* 122:1041–1049.

Powell MJ, Letcher PM, Davis WJ, Holland RB, Vélez CG. 2019. *Rodmanochytrium* is a new genus of chitinophylic chytrids (Chytridiales). *Phytologia* 101:175–187.

Rocha M, Pires-Zottarelli CLA. 2002. Chytridiomycota e Oomycota da Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. *Acta Bot Bras* 16: 287–309.

Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across large model space. *Systematic Biology* 61:539–542.

Schmitz A, Riesner D. 2006. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* 354:311–313.

Seto K, Degawa Y. 2018. *Pendulichytrium sphaericum* gen. et sp. nov. (Chytridiales, Chytriomycetaceae), a new chytrid parasitic on the diatom, *Aulacoseira granulata*. *Mycoscience* 59: 59–66.

Sparrow FK. 1937. Some chytridiaceous inhabitants of submerged insect exuviae. *Proc. Amer. Phil. Soc.*, 78 (1):23–53.

Sparrow FK. 1939. The Entomogenous Chytrid Myrophagus Thaxter. *Mycologia* 31(4):23–53.

Sparrow FK. 1960. *Aquatic Phycomycetes*. 2nd ed. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press. 1187 p.

Stamatakis A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312–1313.

Tedersoo L, Sánchez-Ramírez S, Kõljalg U, Bahram M, Döring M et al. 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Divers* 90(1):135–159.

Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. 2010. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171–180.

Vélez CG, Letcher PM, Schultz S, Powell MJ, Churchill PF. 2011. Molecular phylogenetic and zoospore ultrastructural analyses of *Chytridium olla* establish the limits of a monophyletic Chytridiales. *Mycologia* 103:118–130.

Vélez CG, Letcher PM, Schultz S, Mataloni G, Lefevre E, Powell MJ. 2013. Three new genera from aquatic habitats in Argentina. *Mycologia* 105:1251–1265.

Vilgalys R, Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238–4246.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ,

White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. New York: Academic Press. p. 315–322.

Willoughby LG. 1959. A pure culture of *Chytrium aureus* Karling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 42(1):67–71.

Table I. Taxa, strain number in the CCIBt culture collection or voucher number, location, geographic coordinates and type of samples collected during this study

<b>Taxa</b>	<b>Voucher</b>	<b>Location</b>	<b>Geographic coordinates</b>	<b>Samples</b>
<i>Chytriomycetes hyalinus</i>	SP512558	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°31'35.3"S, 47°17'12.3"W	Submerged leaves
<i>Chytriomycetes hyalinus</i>	CCIBt4410	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°34'18.5"S, 47°26'41.5"W	Submerged leaves
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4389	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°23'51.5"S, 47°07'14.4"W	Water
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4412	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°33'11.1"S, 47°13'34.5"W	Submerged leaves
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4392	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°34'21.1"S, 47°14'53.0"W	Soil
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4013	Parque Estadual da Ilha do Cardoso	25°04'11.0"S, 47°55'3.1"W	Water
<i>Entophlyctis luteolus</i>	CCIBt4018	Parque Estadual da Ilha do Cardoso	25°04'11.0"S, 47°55'3.1"W	Soil
<i>Rhizidium crepaturum</i>	SP512582	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°32'39.5"S, 47°29'22.1"W	Soil
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	CCIBt4413	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°33'11.1"S, 47°13'34.5"W	Surface sediment
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	CCIBt4415	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°33'11.1"S, 47°13'34.5"W	Submerged leaves
<i>Rodmanochytrium sphaericum</i>	CCIBt4546	Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins	24°34'18.5"S, 47°26'41.5"W	Water
<i>Siphonaria aurea</i>	CCIBt4124	Hedberg reservoir	23°25'55.8"S, 47°35'33.1"W	Surface sediment
<i>Siphonaria aurea</i>	CCIBt3846	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga	23°38'18.8"S, 46°37'31.7"W	Submerged leaves
<i>Siphonaria aurea</i>	CCIBt4685	Parque Estadual da Serra do Mar- Núcleo Santa Virginia	23°20'44.1"S, 45°08'45.0"W	Soil

Table II. Taxa, vouchers and GenBank Accession Numbers used in the molecular analyses of Chytridiales. NA: sequence not available

Taxa	Voucher	GenBank Accession Number		
		SSU	ITS	LSU
<i>Boothiomycetes elyensis</i>	PLAUS09	DQ536479	DQ536495	AY439049
<i>B. macroporosum</i>	PLAUS021	DQ322622	AY997084	AY439040
<i>Asterophlyctis michiganensis</i>	JEL 186	AY988500	NA	AY439070
<i>Avachytrium platense</i>	ARG 123	KC812612	JX905548	JX905521
<i>A. platense</i>	ARG050	NA	JX905535	JX905508
<i>Chytridium lagenaria</i>	ARG066	FJ822964	FJ822972	FJ822969
<i>C. olla</i>	ARG 100	FJ822966	FJ822974	NG042508
<i>Chytriomycetes hyalinus</i>	SP512558	MT406240	MT410712	MT406231
<i>C. hyalinus</i>	ATCC 28165	JN940940	JN943811	JN941006
<i>C. hyalinus</i>	CCIBt4410	MT406241	MT410713	MT406232
<i>Cladochytrium tenue</i>	CCIBt4013	KJ539144	KJ539145	KJ539146
<i>C. tenue</i>	CCIBt4389	MT406242	MT410714	NA
<i>C. tenue</i>	CCIBt4412	MT406243	MT410715	MT406233
<i>C. tenue</i>	CCIBt4392	MT406244	MT410716	NA
<i>Delfinachytrium mesopotanicum</i>	ARG113	KC812609	JX905543	JX905516
<i>D. mesopotanicum</i>	ARG117	KC812611	JX905545	JX905518
<i>Dendrochytridium crassum</i>	JEL 353	KC812613	NA	KC812616
<i>D. crassum</i>	JEL 354	AY635827	AY997083	DQ273785
<i>Dinochytrium kinnereticum</i>	JEL 364	KT362375	NA	KT281910
<i>Entophlyctis luteolus</i>	CCIBt4018	KP279670	NA	MT406234
<i>E. luteolus</i>	JEL129	AY988503	NA	AY442957
<i>Fayochytriomycetes spinosus</i>	JEL059	AH009063	NA	DQ273839
<i>Irineochytrium annulatum</i>	JEL729	KC812614	NA	KC812617
<i>Obelidium mucronatum</i>	JEL 57	AH009056	AY349116	AY439071
<i>Odontochytrium milleri</i>	JEL 103	AY349035	JX905549	AY349068
<i>Pendulichytrium sphaericum</i>	KS93	LC223122	LC223124	LC223123
<i>Phlyctochytrium aureliae</i>	KP061	GU358606	GU358608	GU358607
<i>P. bullatum</i>	JEL754	MG271927	NA	KF257905



Taxa	Voucher	GenBank Accession Number		
		SSU	ITS	LSU
<i>P. bullatum</i>	ARG112	KC812608	JX905542	JX905515
<i>P. planicorne</i>	JEL 388	MG271928	NA	KT281909
<i>P. planicorne</i>	JEL047	DQ536473	AY997070	DQ273813
<i>Phlyctorhiza endogena</i>	JEL80	AH009058	NA	MH411130
<i>Podochytrium dentatum</i>	JEL 30	AY349030	DQ536501	AY439060.
<i>Pseudorhizidium endosporangium</i>	JEL 221	DQ536484	DQ536496	AY988509
<i>Rhizidium crepaturum</i>	SP512582	MT406246	MT410718	MT406236
<i>R. phycophilum</i>	KP013	KC812615	FJ214803	FJ214802
<i>R. phycophilum</i>	JEL378	NA	FJ214804	DQ273832
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	CCIBt4413	MN511696	MN509016	MN508395
<i>R. globosum</i>	CCIBt4415	MN511697	MN509017	MN508396
<i>R. globosum</i>	WM 200.1	NA	JX905559	JX905529
<i>R. globosum</i>	WB 266C	NA	JX905558	JX905528
<i>R. globosum</i>	ARG 043	NA	JX905534	JX905507
<i>Rodmanochytrium sphaericum</i>	MP41	NA	JX905551	JX905522
<i>R. sphaericum</i>	MP59	NA	JX905554	JX905525
<i>R. sphaericum</i>	ARG 012	NA	JX905531	JX905504
<i>R. sphaericum</i>	ARG 039	NA	JX905533	JX905506
<i>R. sphaericum</i>	CCIBt4546	MT406245	MT410717	MT406235
<i>R. pyriforme</i>	MP72	NA	NA	MK543214
<i>Siphonaria aurea</i>	CCIBt4685	MT406247	MT410719	MT406237
<i>S. aurea</i>	CCIBt4124	MT406248	MT410720	MT406238
<i>S. aurea</i>	CCIBt3846	NA	MT410721	MT406239
<i>S. petersenii</i>	JEL 102	AY349036	AY349115	AY439072
<i>Siphonaria</i> sp.	JEL 065	NA	NA	AY988508
<i>Wheelerophlyctis interiexterior</i>	JEL857	NA	NA	MH539701
<i>W. interiexterior</i>	JEL885	NA	NA	MH539702
<i>W. interior</i>	MP058	NA	NA	MH539699
<i>W. interior</i>	JEL524	NA	NA	MH539700
<i>Zopfochytrium polystomum</i>	WB228	KF711853	NA	KF711852

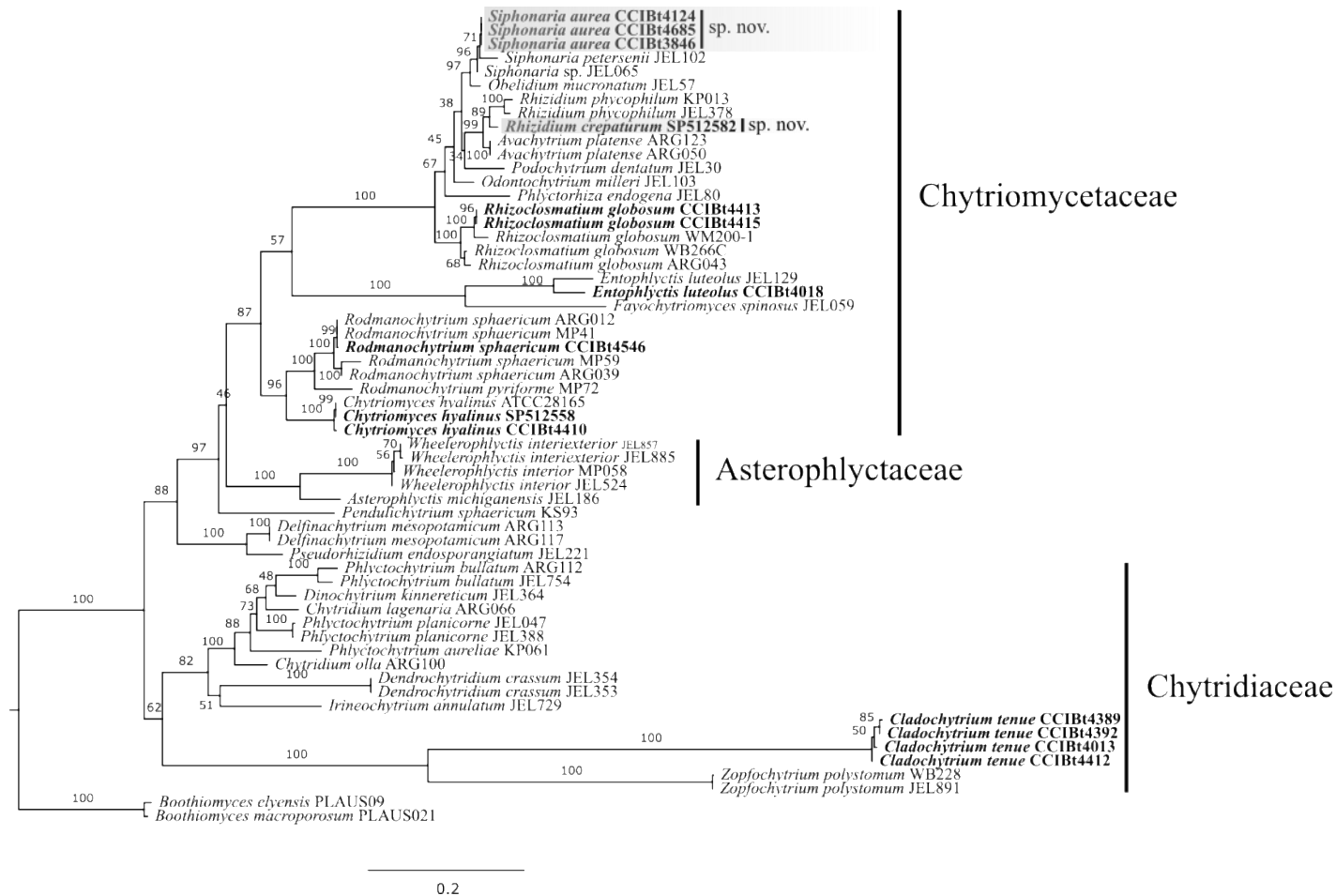


Figure 1. Phylogram of Chytridiales inferred from Maximum likelihood analysis of a combined dataset (SSU + 5.8S + LSU sequence data). Maximum likelihood bootstrap support values < 50% are indicated with (-). Bayesian posterior probability values > 0.50 are labelled numerically. The clades that were not recovered in the Bayesian tree are indicated with (0). The scale bar indicates the average number of substitutions per site. Sequences from this study are indicated in boldface.

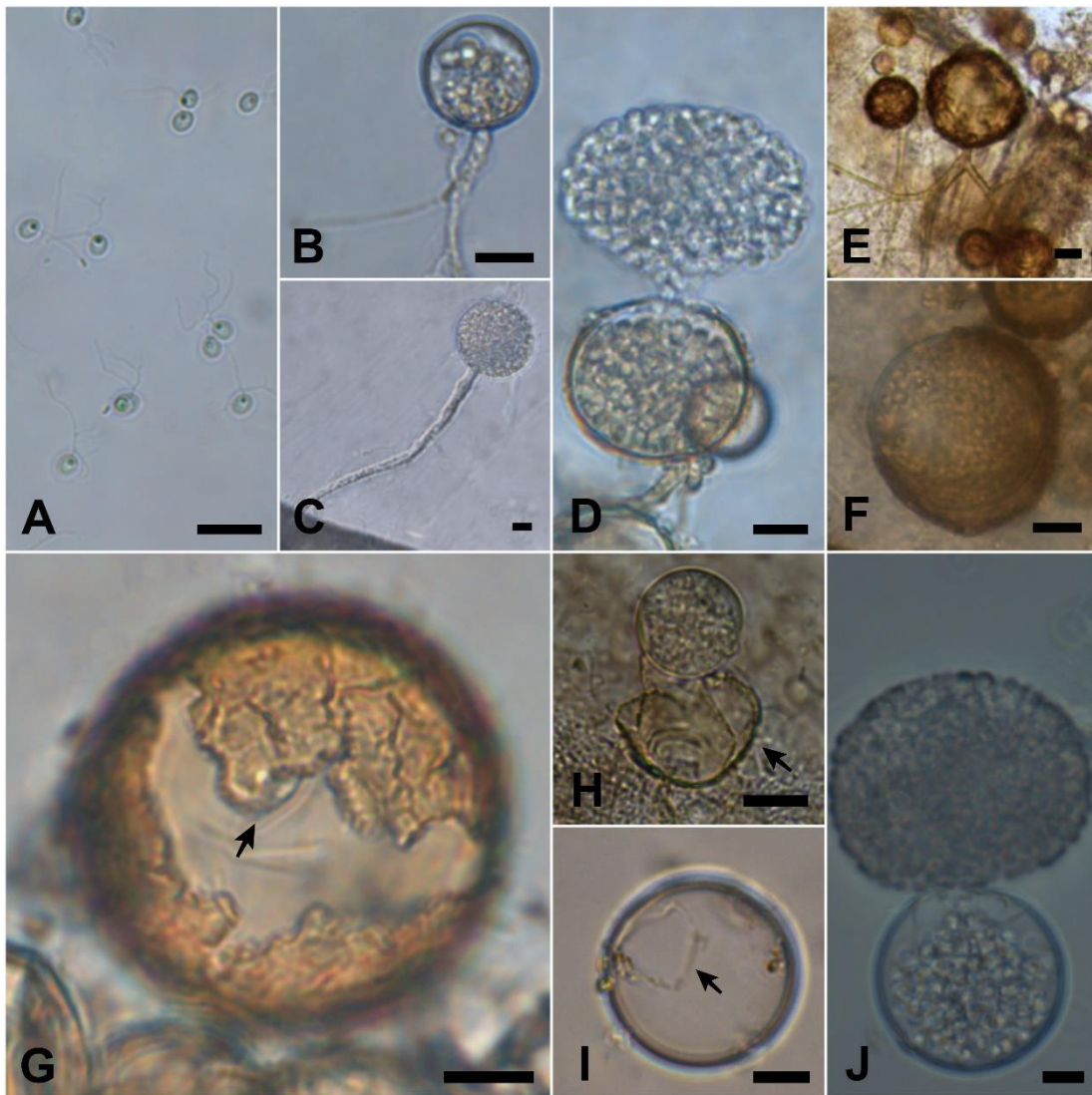


Figure 2. Morphology of *Rhizidium crepaturum* SP512582 on shrimp exoskeleton and snakeskin. A. Zoospores with a single hyaline lipid globule. B. Young spherical zoosporangium. C. Spherical zoosporangium with a long rhizoidal axis. D. Zoospore discharge. E-F. Yellowish or brown resting spores in shrimp exoskeleton. G. Germination of the resting spore with complete breakage of the spore wall (arrow). H. Zoosporangium germinated from the resting spore (arrow). I. Zoosporangium with broken wall after zoospore discharge (arrow). J. Zoospore discharge. Bars=10 $\mu$ m.

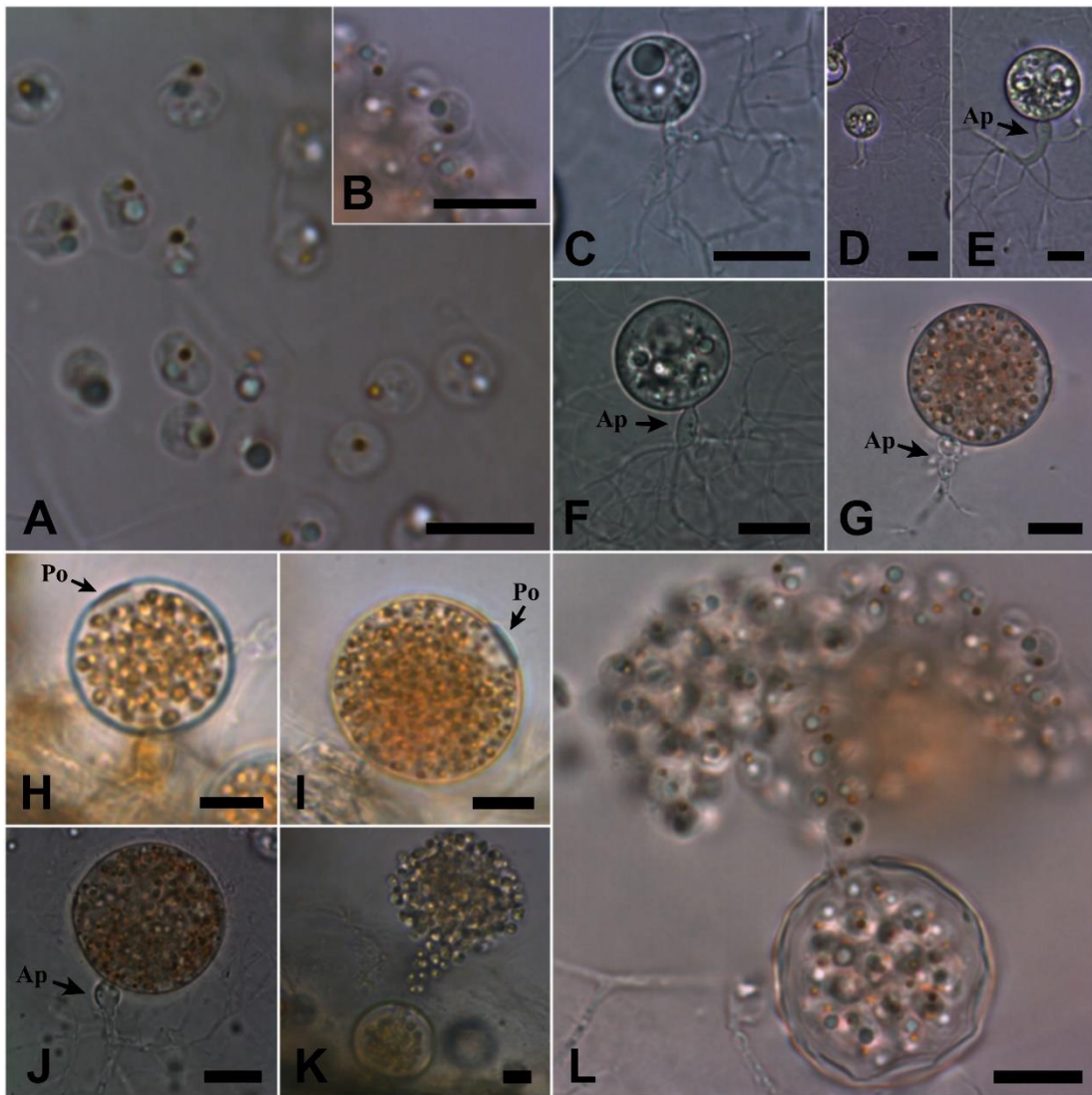


Figure 3. Morphology of *Siphonaria aurea* CCIBt4685 on shrimp exoskeleton, snakeskin and mPmTG culture medium. A-B. Zoospores with two lipid globules. C-F. Young thallus in which no pigments are visible. G. Young zoosporangium. H-I. Mature zoosporangia with a thick and dark pore region. J. Mature apophysate zoosporangium. K-L. Zoospore discharge. Ap=apophysis; Po=pore. Bars=10 $\mu$ m.

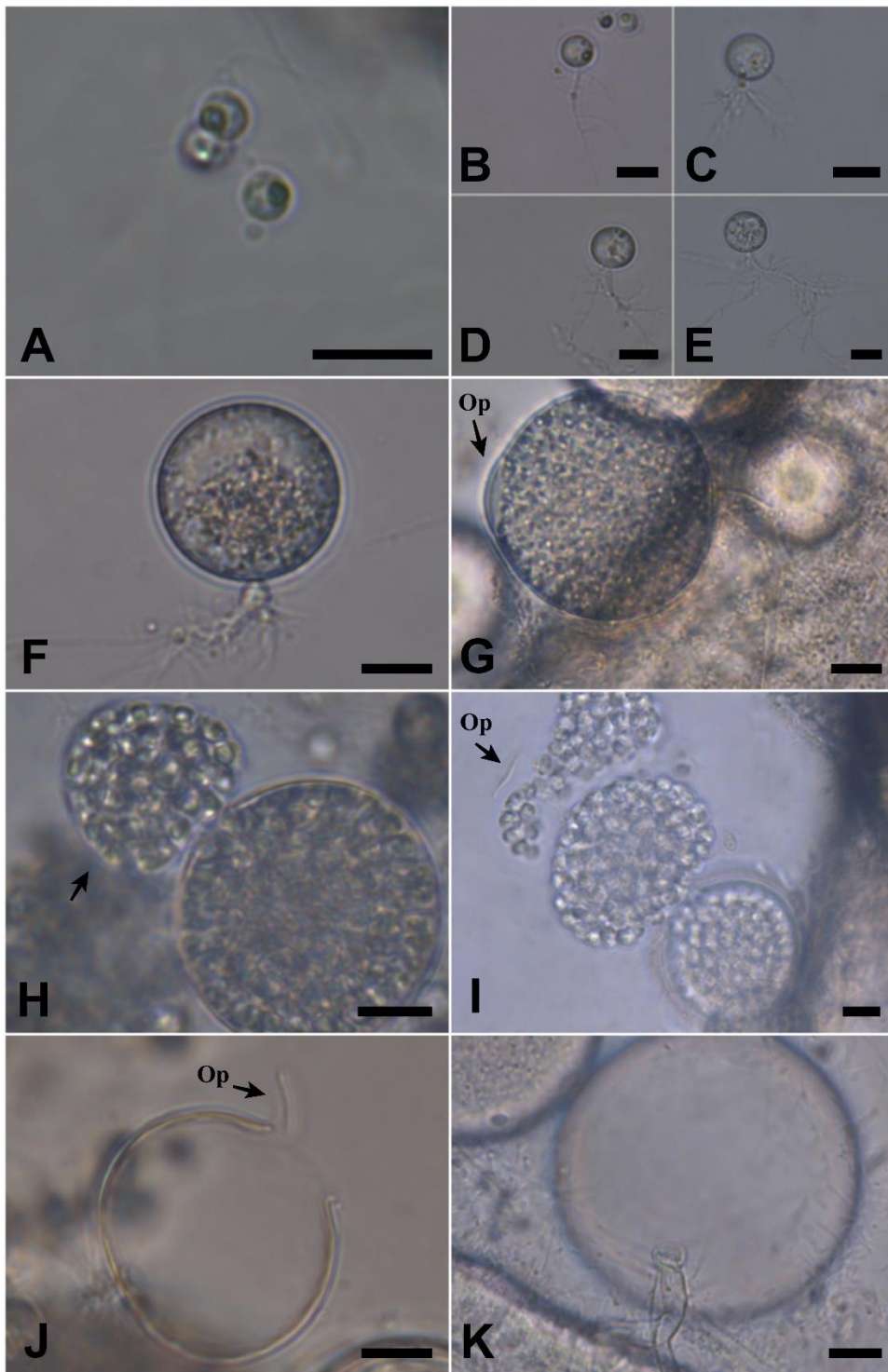


Figure 4. Morphology of *Rodmanochytrium sphaericum* CCIBt4546 on shrimp exoskeleton and mPmTG culture medium. A. Zoospores with a single hyaline lipid globule. B-F. Development of the thallus. G. Mature zoosporangium. H-I. Zoospore discharge (arrow). J. Operculum visible after zoospore discharge. K. Insertion of the rhizoidal system in the zoosporangium. Op=operculum. Bars=10 $\mu$ m.

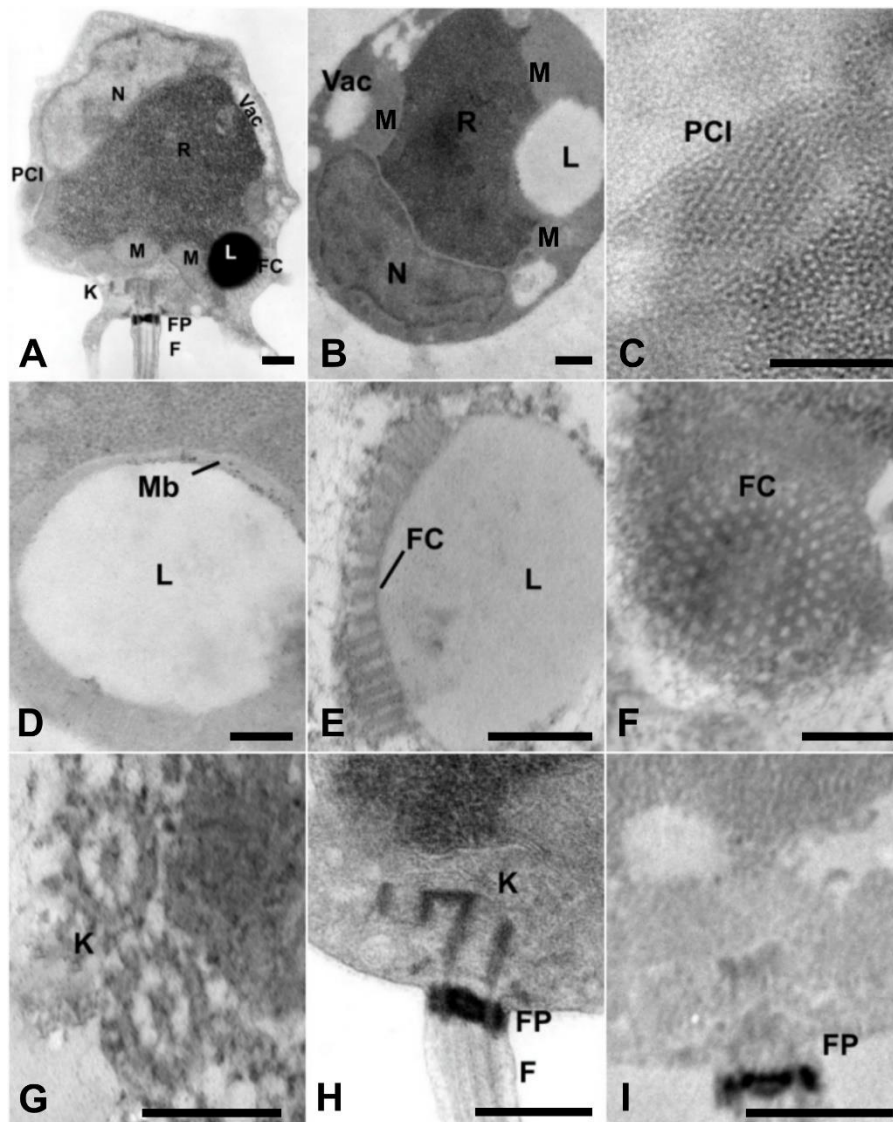


Figure 5. Zoospore ultrastructure of *Siphonaria aurea* CCIBt4685. A-B. Longitudinal section of the zoospore. C. Transverse section of the PCI. D. Transverse section showing microbody and lipid globule. E. Longitudinal section of fenestrated cisterna. F. Transverse section of fenestrated cisterna. G. Kinetosome and non-flagellated centriole connected by a fibrillary bridge. H. Longitudinal section of the flagellum base with kinetosome, nonflagellated centriole and flagellar plug. I. Longitudinal section of the flagellar plug. F. Flagellum. Fb= Fibrillary bridge. FC= Fenestrated cisterna. FP= Flagellar plug. K = Kinetosome. L= Lipid globule. Mb= Microbody. M= Mitochondrion. N= Nucleus. NfC= Nonflagellated centriole. R= Ribosomes. Vac= Vacuoles. Bars=0.2 $\mu$ m.

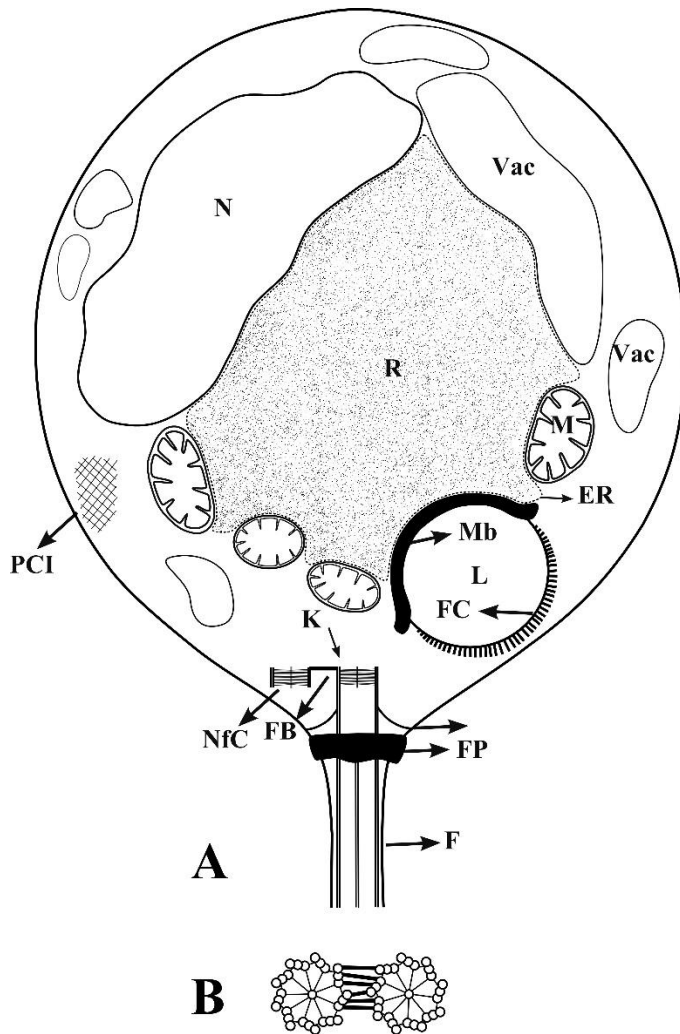


Figure 6. Schematic drawing of the zoospore ultrastructure of *Siphonaria aurea* CCIBt4685. A. Longitudinal section. ER= Endoplasmic reticulum. F. Flagellum. Fb= Fibrillary bridge. FC= Fenestrated cisterna. FP= Flagellar plug. K = Kinetosome. L= Lipid globule. Mb= Microbody. M= Mitochondrion. N= Nucleus. NfC= Nonflagellated centriole. R= Ribosomes. Vac= Vacuoles. B. Transverse section of the kinetosome and nonflagellated centriole.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nesta tese representam a importância de levantamentos de fungos zoospóricos, evidenciando que: (i) mesmo com grande parte dos estudos brasileiros terem sido realizados em áreas de Mata Atlântica, ainda há táxons desconhecidos a serem isolados e descritos; (ii) a inclusão de espécimes brasileiros em análises filogenéticas não apenas corroboram com a sistemática dos filós, mas também apresentam novas topologias aos grupos; (iii) análises da ultraestrutura dos zoósporos destes fungos corroboram as análises filogenéticas, subsidiando, com novas características, as segregações dos grupos.

Como novidade, em termos de diversidade, foi identificado um novo gênero (*Karlingiella*), três novos táxons para a ciência (*Kappamyces microporosus*, *Rhizidium crepaturum* e *Siphonaria aurea*), bem como cinco novas citações para o Brasil (*Angulomyces argentinensis*, *Karlingiomyces marylandicus*, *Podochytrium chitinophilum*, *Rhizoclostratium globosum* e *Rodmanochytrium sphaericum*). Outros dois táxons (*Entophlyctis* sp. SP512573 e *Rhizophlyctis* sp. SP512570) são possíveis espécies novas, mas por dificuldades no isolamento e manutenção, não foi possível a finalização da identificação em nível específico.

As análises filogenéticas das regiões SSU, ITS e LSU rDNA, com inclusões de isolados brasileiros dos filós de fungos zoospóricos aqui estudados, revelaram a importância de estudos em áreas não exploradas, com evidências de novos táxons, assim como o clareamento da sistemática e de novas topologias quando incluímos isolados provenientes de várias partes do mundo, obtidas principalmente nas ordens Chytridiales e Cladochytriales (filo Chytridiomycota).

As análises de ultraestrutura dos zoósporos de algumas das espécies estudadas revelaram características importantes a serem incluídas na sistemática do grupo, assim como variações e novos caracteres dentro do mesmo grupo taxonômico.

Como objetivos adicionais desta tese, foram realizados testes de temperatura e crescimento em diferentes meios de cultura, além da técnica de criopreservação. Os testes foram realizados pela necessidade de melhor preservar os isolados em meio de cultura, afim de auxiliar na preservação dos espécimes em coleções de cultura. Sendo os fungos zoospóricos mais delicados e de difícil manutenção, o conhecimento sobre a melhor temperatura e meio de cultura se faz necessário, evitando perda dos isolados. Os resultados obtidos foram enviados para a curadoria da coleção CCIBt, por meio de fichas preenchidas no momento dos depósitos das culturas. O material criopreservado, das



espécies testadas e preservadas com sucesso, também foram incorporados ao acervo da coleção CCIBt.

Além dos capítulos apresentados, dois novos artigos ficaram por finalizar, os quais ainda necessitam de dados para a sua conclusão. O primeiro com a inclusão de uma nova família na ordem Cladochytriales, incluindo as características de ultraestrutura do zoósporo de *Karlingiella elongata*, e a descrição de nova espécie para o gênero *Cladochytrium*. O segundo inclui análises da ultraestrutura dos zoósporos de *Cladochytrium tenue* (descrito como tipo do gênero e ordem Cladochytriales) e uma possível transferência para um novo gênero de Chytridiales.

Por fim, este trabalho contribuiu para o aumento do conhecimento da diversidade de fungos zoospóricos para a Mata Atlântica no Estado de São Paulo, com novas citações para o país e novos táxons para a ciência. Além disso, ampliou as informações moleculares desses fungos depositados em bancos de dados gênicos. Por meio dos resultados obtidos recomenda-se que análises gênicas e de ultraestrutura sejam feitas juntamente com as observações morfológicas quando do estudo dos táxons de fungos zoospóricos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attili, D.S.** 1994. Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Barr, D.J.S.** 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* 58:2380–2394.
- Barr, D.J.S.** 1984. The classification of *Spizellomyces*, *Gaertneriomyces*, and *Kochiomyces* (Spizellomycetales, Chytridiomycetes). *Canadian Journal of Botany* 62:1171–1201.
- Barr, D.J.S.** 2001. Chytridiomycota. In: Esser K, Lemke PA (eds) *The mycota, systematics and evolution*, vol VIIA. Springer, New York, pp 93–112
- Beneke, E.S. & Rogers, L.** 1962. Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais. São Paulo and Paraná, Brazil. *Rickia* 1:181–193.
- Beneke, E.S. & Rogers, A.L.** 1970. Aquatic fungi of Parque Nacional do Itatiaia in the State of Rio de Janeiro. *Rickia* 5:51–64.

- Boyle, D.G., Hyatt, A.D., Daszak, P., Berger, L., Longcore, J.E., Poter, D., Hengstberger, S.G. & Olsen, V.** 2003. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other Chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:59–64.
- Butler, E.J.** 1911. On *Allomyces*, a new aquatic fungus. *Annals of Botany* 25:1023–1035.
- Dee, J.M., Mollicone, M.R.N., Longcore, J.E., Roberson, R.W. & Berbee, M.L.** 2015. Cytology and molecular phylogenetics of Monoblepharidomycetes provide evidence for multiple independent origins of the hyphal habit in the Fungi. *Mycologia* 107(4):710–728.
- Doweld, A.** 2001. *Prosyllabus tracheophytorum: Tentamen systematis plantarum vascularium (Tracheophyta)*. Geos, Moscow, pp 1–110.
- Emerson, R.** 1968. Thermophiles. In: Ainsworth, G.C., Sussman, A.S. (eds). *The fungi. An advanced treatise, vol III, The fungal population*. Academic Press, London, pp. 105–128.
- Garlipp, A.B.** 1995. Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Gleason, F.H.** 1971. Alcohol dehydrogenases in Mucorales. *Mycologia* 63: 906–910.
- Gleason, F.H., Mosley-Strandridge, S.E., Poter, D., Boyle, D.G. & Hyatt, A.D.** 2007. Preservation of Chytridiomycota in culture collections. *Mycological Research* 111:129–136.
- Grandi, R.A.P. & Attili, D.S.** 1996. Hyphomycetes on *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Mull. Arg. leaf litter from the Ecological Reserve of Juréia-Itatins, State of São Paulo, Brazil. *Mycotaxon* 60:373–386.
- Gruninger, R.J., Puniya, A.K., Callaghan, T.M., Edwards, J.E., Noha Youssef, N. et al.** 2004. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology* 90:1–17.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- Hammer, Ø. Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

- Hibbett, D., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M. et al.** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111:509–547.
- James, T.Y., Porter, D., Leander, C.A., Vilgalys, R. et al.** 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany* 78:1-15.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E. et al.** 2006 a. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98:860–871.
- James, T.Y., Poter, T.M. & Martin, W.W.** 2014 b. Blastocladiomycota. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds) *Systematics and evolution*. Springer, Heidelberg, pp. 177–207
- James, T.Y., Toledo, L.F., Rödder, D., Leite, D.S., Belasen, A.M., et al.** 2015. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution* 5(18):4079–4097.
- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Marano, A.V., James, T.Y., de Souza, J. I., Rocha, S.C.O. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2015. Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP, Brasil. *Hoehnea* 42(1):135–163.
- Jerônimo, G.H., Jesus, A.L., Simmons, D.R., James, T.Y. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2019 a. Novel taxa in Cladochytriales (Chytridiomycota): *Karlingiella* (gen. nov.) and *Nowakowskiella crenulata* (sp. nov.). *Mycologia* 111(3):506–516.
- Jerônimo, G.H., Simmons, D.R., James, T.Y. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2019 b. *Boothiomycetes angulosus* and *Boothiomycetes elyensis*: two new combinations in the Terramycetaceae (Rhizophydiales, Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* 109(4):399–412.
- Jesus, A.L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40:167–180.
- Karling, J.S.** 1977. *Chytridiomycetarum Iconographia*. Lubrecht & Cramer, Vaduz.
- Karpov, S.A., Mamanazarova, K.S., Popova, P.V., Aleoshin, V.V., James, T.Y., et al.** 2017. Monoblepharidomycetes diversity includes new parasitic and saprotrophic species with highly intronized rDNA. *Fungal biology* 121(8):729–741.

- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D.** 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* **18**:1–7.
- Kershaw, K.A.** 1973. *Quantitative and dynamic plant ecology*. American Elsevier Publishing Co, New York, pp. 1–392
- Koch, W.J.** 1958. Studies of the motile cells of chytrids. II. Internal structure of the body observed with light microscopy. *American Journal of Botany* **45**:59–72.
- Koch, W.J.** 1961. Studies of the motile cells of chytrids. III. Major types. *American Journal of Botany* **48**:786–788.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2001. Distributions of the Blue Ridge and Appalachian Mountains of Virginia. *Mycologia* **93**(6):1029–1041.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J.** 2005. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). *Nowa Hedwigia* **80**:115–133.
- Letcher, P.M. & Power, M.J.** 2014. Hypothesized evolutionary trends in zoospore ultrastructural characters in Chytridiales (Chytridiomycota). *Mycologia* **106** (3):370–396.
- Letcher, P.M., Vélez, C.G., Barrantes, M.E., Powell, M.J., Churchill, P.F. & Wakefield, W.S.** 2008. Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. *Mycological Research* **112**:759–782.
- Lyra, N.P. & Milanez, A.I.** 1974. Notas para o levantamento dos ficomicetos aquáticos do Estado de São Paulo. Recife, PE, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Publicação 698:1–27.
- Longcore, J.E.,** 1995. Morphology and zoospore ultrastructure of *Entophlyctis luteolus* sp. nov. (Chytridiales): Implications for chytrid taxonomy. *Mycologia* **87**:25–33.
- Maia, L.C. & Carvalho Jr., A.A.** Fungos in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB120629>>. Acesso em: 25 Maio de 2015.
- Marano, A.V., Barrera, M.D., Steciow, M.M., Donadelli, J.L., Saparrat, M.C.N.** 2008. Frequency, abundance and distribution of zoosporic organisms from Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina). *Mycologia* **100**(5):691–700.

- Marano, A.V., Jesus, A.L., de Souza, J.I., Leño, E.M., James, T.Y., Jerônimo, G.H., de Cock, A.W.A.M., Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2014. A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5 (4):510–522.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F.** 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:15325–15329.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. In: Fidalgo O. & Bononi V.L. (cords.) Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série documentos, São Paulo, Brasil, pp. 17–20.
- Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Schoenlein-Crusius, I.H.** 1994. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 1. Monoblepharidales. *Hoehnea* 21:157–161.
- Mozley-Standridge, S.E., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Porter, D. & Simmons, D.R.** 2009. Cladochytridiales- a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research*. 113:498-507.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2009. Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23:459–473.
- Nascimento, C.A. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2010. Blastocladiales e Spizellomycetales do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 33:693–704.
- Pinto, I.M.A.** 1999. As micotas filamentosas do solo e da água do Rio Una do Prelado, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Pires-Zottarelli, C.L.A., Milanez, A.I., Schoenlein-Crusius, I.H. & Lohmann, L.G.** 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos Chytridiales. *Hoehnea* 23:77–90.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1999. Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, São Paulo, SP, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Gomes, A.L.** 2007. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica* 7:309–329.
- Pires-Zottarelli, C.L.A. & Rocha, M.** 2007. Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 21:125–136.
- Posada, D.** 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253–1256.
- Porter, T.M., Martin, W., James, T.Y., Longcore, J.E., Gleason, F.H., Adler, P.H., Letcher, P.M., Vilgalys, R.** 2011. Molecular phylogeny of the Blastocladiomycota (Fungi) based on nuclear ribosomal DNA. *Fungal Biology* 115:381–392.
- Powell, M.J.** 1993. Looking at mycology with a Janus face: a glimpse of Chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia* 85:1–20.
- Powell, M. & Letcher, P.M.** 2012. From zoospores to molecules: The evolution and systematics of Chytridiomycota *in* Systematics and evolution of Fungi. New York. Science Publishers pp. 29–54.
- Powell, M.J. & Letcher, P.M.** 2014 a. “Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota.” *In*: Esser K (Ed.) The Mycota VII Systematics and Evolution PartA. Springer, pp. 141–175
- Powell, M.J. & Letcher, P.M.** 2014 b. “Phylogeny and characterization of freshwater Chytridiomycota (Chytridiomycetes and Monoblepharidomycetes)”. *In*: Gareth Jones EB, Hyde KD, Pang K-L (eds.). Freshwater fungi. de Gruyter: Germany., pp.133–153.
- Prada, G.M. & Pagnocca, F.C.** 1997. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. *Folia Microbiologica* 42:39–46.
- Rogers, A.L., Milanez, A.I. & Beneke, E.S.** 1970. Additional aquatic fungi from São Paulo State. *Rickia* 5:93–110.
- Ronquist, F., Teslenko M., van der Mark, P., Ayres D., Darling, A., H’ohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., & Huelsenbeck, J.P.** 2011. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3):539–542.
- São Paulo (Estado de São Paulo).** 2009. Mosaico Juréia-Itatins. 2009. Disponível em: [http://fflorestal.sp.gov.br/files/2012/03/Anexo1\\_Boletim\\_Mosaico\\_Jureia.pdf](http://fflorestal.sp.gov.br/files/2012/03/Anexo1_Boletim_Mosaico_Jureia.pdf). Acessado em: set 2019.

- Sanches, R.A.** 2006. Caiçaras e o Mosaico de Unidades de Conservação Jureia-Itatins: desafios para a gestão. *UNISANTA Bioscience* 5:1–11.
- Schmitz, A. & Riesner, D.** 2006. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* 354:311–313.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J. et al.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation* 16:49–67.
- Simon, J.O., Rieux, A., Farrer, R.A., Rosa, G.M., Waldman, B., et al.** 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360:621–627.
- Souza, C.R.G & Souza, A. P.** 2004. Geologia e Geomorfologia da área da Estação Ecológica Juréia-Itatins. *In: Maruque O. A. V. & Duleba W. (eds.) Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna. Ribeirão Preto: Holos, pp. 16–33.*
- Sparrow, F.K.** 1960. *Aquatic Phycomycetes*. University of Michigan Press. 2<sup>a</sup> ed. Ann Arbor.
- Stamatakis, A.** 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033 <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>
- Tarifa, J.R.** 2004. Unidades Climáticas dos Maciços Litorâneos da Juréia-Itatins. *In: Maruque O. A. V. & Duleba W. (eds.) Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna. Ribeirão Preto: Holos, pp. 42–50.*
- Tauk-Tornisielo, S.M., Giannotti, A.M.D., Ruegger, M.J.S. & Malagutti, E.N.** 2000. Aphylllophorales from the Atlantic rainforest of the Ecological Station of Jureia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Ecology* 4:99–105.
- Tedersoo, L., Sanches-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Doring, M. et al.** 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal diversity* 90(1):135–159. doi: 10.1007/s13225-018-0401-0
- Vaidya G., Lohman D.J., Meier R.** 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27:171–180.
- Velez, C.G., Letcher, P.M., Schultz, S.E., Powell, M.J. & Churchill, P.F.** 2001. Molecular phylogenetic and zoospore ultrastructural analyses of *Chytridium olla* establish the limits of a monophyletic Chytridiales. *Mycologia* 103:118–130.

- Velez, C.G., Letcher, P.M., Schultz, S., Mataloni, G. Lefrève, E. & Powell, M.J.** 2013. Three new genera in Chytridiales from aquatic habitats in Argentina. *Mycologia* 105:1251–1265
- Vilgalys, R. & Hester, M.** 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238–4246.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J (eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315–322.
- Zak, J.C. & Willig, M.R.** 2004. Fungal biodiversity patterns. In: Mueller, G.M., Bills, G.F, Foster, M.S. (eds.) *Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods*. USA: Elsevier Academic Press, pp. 59–75.



# **ANEXO I**

(Tabelas contendo dados dos fatores abióticos mensurados durante as coletas)

**Tabela 1.** Fatores abióticos da água mensurados durante as coletas nos diferentes locais de coleta no Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins. L=Local de coleta. DP=Desvio Padrão. OD=Oxigênio Dissolvido.

Fatores/ Coletas		Temperatura	pH	Condutividade	OD (mg.L <sup>-1</sup> )
		(°C)		(µS.cm <sup>-1</sup> )	
		Média/DP	Média/DP	Média/DP	Média/DP
1 <sup>a</sup> Coleta	L1	15,76 ± 0,21	4,24 ± 0,06	0,02 ± 0,00	8,83 ± 0,51
	L2	15,60 ± 0,01	4,07 ± 0,05	0,02 ± 0,00	7,80 ± 0,36
	L3	16,15 ± 0,03	4,77 ± 0,16	0,03 ± 0,00	8,23 ± 0,16
	L4	16,25 ± 0,17	4,64 ± 0,10	0,05 ± 0,01	8,46 ± 0,57
	L5	16,34 ± 0,14	4,01 ± 0,04	0,04 ± 0,00	8,55 ± 0,22
	L6	16,82 ± 0,20	4,58 ± 0,04	0,05 ± 0,00	5,95 ± 0,96
	L7	16,56 ± 0,07	4,37 ± 0,10	0,03 ± 0,01	8,25 ± 0,52
	L8	17,28 ± 0,14	4,03 ± 0,03	0,03 ± 0,00	7,96 ± 0,69
	L9	16,96 ± 0,16	4,61 ± 0,10	0,03 ± 0,00	8,00 ± 0,43
	L10	18,35 ± 0,19	4,69 ± 0,09	0,05 ± 0,00	8,42 ± 0,09
	L11	17,94 ± 0,39	5,36 ± 0,66	0,03 ± 0,00	7,33 ± 0,15
	L12	17,95 ± 0,17	4,62 ± 0,03	0,03 ± 0,00	8,47 ± 0,15
2 <sup>a</sup> Coleta	L13	23,75 ± 0,22	6,45 ± 0,11	0,03 ± 0,00	8,78 ± 0,40
	L14	23,57 ± 0,16	6,32 ± 0,06	0,03 ± 0,00	8,05 ± 1,08
	L15	23,45 ± 0,01	6,31 ± 0,06	0,03 ± 0,00	7,50 ± 0,14
	L16	23,72 ± 0,11	5,69 ± 0,03	0,05 ± 0,00	8,49 ± 0,18
	L17	21,80 ± 0,02	6,01 ± 0,25	0,03 ± 0,00	8,12 ± 0,94
	L18	23,13 ± 0,36	6,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	8,81 ± 0,916
	L19	22,79 ± 0,23	6,76 ± 0,04	0,02 ± 0,00	6,59 ± 0,37
	L20	22,13 ± 0,29	6,62 ± 0,04	0,03 ± 0,00	8,37 ± 0,66
	L21	24,61 ± 0,67	6,75 ± 0,12	0,04 ± 0,00	7,39 ± 1,13
	L22	23,57 ± 0,01	6,87 ± 0,05	0,04 ± 0,00	7,74 ± 0,38
	L23	24,52 ± 0,03	6,86 ± 0,15	0,03 ± 0,00	7,28 ± 0,16
	L24	25,66 ± 0,09	7,03 ± 0,05	0,03 ± 0,00	6,24 ± 0,38
3 <sup>a</sup> Coleta	L25	20,21 ± 0,25	4,52 ± 0,13	0,31 ± 0,38	6,40 ± 2,13
	L26	19,70 ± 0,25	5,92 ± 0,19	0,07 ± 0,00	6,94 ± 0,23
	L27	19,52 ± 0,11	5,58 ± 0,08	0,09 ± 0,00	4,47 ± 0,06
	L28	17,63 ± 0,10	5,15 ± 0,76	0,05 ± 0,02	6,38 ± 0,54
	L29	17,76 ± 0,02	5,87 ± 0,18	0,03 ± 0,00	6,08 ± 1,01
	L30	19,30 ± 0,25	5,63 ± 0,11	0,05 ± 0,00	5,41 ± 0,24
	L31	18,52 ± 0,01	5,25 ± 0,09	0,05 ± 0,00	5,98 ± 0,23
	L32	18,42 ± 0,04	5,89 ± 0,12	0,04 ± 0,00	6,40 ± 0,53
	L33	17,99 ± 0,13	4,85 ± 0,06	0,06 ± 0,00	5,86 ± 0,09

Fatores/ Coletas	Temperatura (°C)	pH	Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	OD ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
	Média/DP	Média/DP	Média/DP	Média/DP	
<b>L34</b>	17,94 ± 0,04	4,91 ± 0,06	0,06 ± 0,00	5,68 ± 0,57	
<b>L35</b>	17,99 ± 0,01	4,65 ± 0,21	0,06 ± 0,00	5,97 ± 0,07	
<b>L36</b>	17,49 ± 0,14	6,47 ± 0,28	0,03 ± 0,00	7,52 ± 0,07	
<b>4ª Coleta</b>	<b>L37</b>	19,31 ± 0,04	6,63 ± 0,14	0,13 ± 0,00	4,51 ± 0,64
	<b>L38</b>	19,26 ± 0,01	5,82 ± 0,04	0,12 ± 0,01	3,39 ± 1,24
	<b>L39</b>	20,00 ± 0,22	5,66 ± 0,44	0,10 ± 0,03	7,20 ± 0,11
	<b>L40</b>	19,72 ± 0,01	6,28 ± 0,26	0,09 ± 0,00	8,29 ± 0,18
	<b>L41</b>	20,14 ± 0,01	5,47 ± 0,25	0,09 ± 0,00	5,53 ± 0,47
	<b>L42</b>	20,07 ± 0,19	6,18 ± 0,34	0,09 ± 0,00	5,79 ± 0,44
	<b>L43</b>	21,15 ± 0,04	6,26 ± 0,25	0,09 ± 0,00	7,58 ± 0,38
	<b>L44</b>	21,04 ± 0,01	6,48 ± 0,10	0,10 ± 0,00	7,04 ± 0,67
	<b>L45</b>	20,89 ± 0,08	5,59 ± 0,06	0,08 ± 0,01	5,80 ± 0,54

**Tabela 2.** Fatores abióticos do solo mensurados durante as coletas nos diferentes locais de coleta no Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins L=Local de coleta. DP=Desvio Padrão.

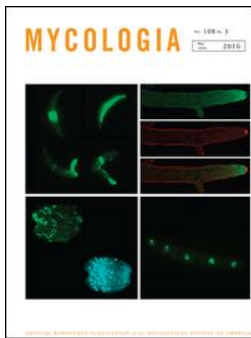
Fatores/Coletas	Temperatura (°C)	pH	Umidade (%)	
<b>1ª Coleta</b>	<b>L1</b>	16,67	6,14	15,71
	<b>L2</b>	17,05	5,90	10,26
	<b>L3</b>	15,63	5,96	5,98
	<b>L4</b>	16,63	5,91	26,8
	<b>L5</b>	16,73	5,83	46,76
	<b>L6</b>	17,03	5,72	8,44
	<b>L7</b>	17,23	5,90	31,57
	<b>L8</b>	17,10	6,27	32,71
<b>2ª Coleta</b>	<b>L9</b>	23,10	5,65	10,24
	<b>L10</b>	24,20	5,94	49,64
	<b>L11</b>	23,80	5,10	36,08
	<b>L12</b>	23,47	5,37	51,82
	<b>L13</b>	24,53	5,16	23,43
	<b>L14</b>	25,03	5,16	10,78
<b>3ª Coleta</b>	<b>L15</b>	26,40	5,49	18,86
	<b>L16</b>	19,63	5,08	14,65
	<b>L17</b>	19,97	5,53	27,43
	<b>L18</b>	19,23	5,56	44,42
	<b>L19</b>	18,80	6,89	20,19
	<b>L20</b>	18,97	6,93	18,67
	<b>L21</b>	18,80	6,33	38,16
	<b>L22</b>	20,83	5,16	3,68
	<b>L23</b>	25,30	5,93	6,09

<b>Fatores/Coletas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Umidade (%)</b>
<b>L24</b>	20,27	6,15	38,73
<b>L25</b>	16,57	6,67	24,87
<b>L26</b>	19,67	4,97	18,66
<b>L27</b>	19,83	5,38	59,15
<b>L28</b>	20,70	4,57	43,27
<b>L29</b>	20,67	4,45	26,92
<b>L30</b>	20,00	4,36	78,28
<b>L31</b>	20,80	4,26	24,59
<b>L32</b>	20,33	4,47	38,48
<b>L33</b>	20,07	4,66	90,94
<b>L34</b>	20,07	4,35	91,74
<b>L35</b>	19,90	4,53	91,91
<b>L36</b>	21,67	4,53	91,42
<b>L37</b>	20,53	4,97	26,97
<b>L38</b>	20,67	4,67	23,09
<b>L39</b>	20,80	5,95	27,42
<b>L40</b>	22,07	5,60	16,9
<b>L41</b>	21,97	5,90	10,95
<b>L42</b>	21,13	5,03	37,21
<b>L43</b>	19,63	6,03	38,53
<b>L44</b>	21,50	5,72	59,09
<b>L45</b>	21,97	5,62	12,99

4ª Coleta

## **ANEXO II**

(Artigo publicado na Revista Mycologia 111(3):506–516)



## Novel taxa in Cladochytriales (Chytridiomycota): *Karlingiella* (gen. nov.) and *Nowakowskiella* *crenulata* (sp. nov.)

Gustavo H. Jerônimo, Ana L. Jesus, D. Rabern Simmons, Timothy Y. James & Carmen L. A. Pires-Zottarelli

To cite this article: Gustavo H. Jerônimo, Ana L. Jesus, D. Rabern Simmons, Timothy Y. James & Carmen L. A. Pires-Zottarelli (2019): Novel taxa in Cladochytriales (Chytridiomycota): *Karlingiella* (gen. nov.) and *Nowakowskiella crenulata* (sp. nov.), *Mycologia*

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1588583>



Published online: 23 Apr 2019.






Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Novel taxa in Cladochytriales (Chytridiomycota): *Karlingiella* (gen. nov.) and *Nowakowskiella crenulata* (sp. nov.)

Gustavo H. Jerônimo <sup>a</sup>, Ana L. Jesus<sup>a</sup>, D. Rabern Simmons <sup>b</sup>, Timothy Y. James <sup>b</sup>, and Carmen L. A. Pires-Zottarelli<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, São Paulo, São Paulo 04301-902, Brazil; <sup>b</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109-1085

### ABSTRACT

Six *Nowakowskiella* species from Brazil were identified and purified on corn meal agar (CMA) plus glucose and Peptonized Milk-Tryptone-Glucose (PmTG) media and placed into a phylogenetic framework for the genus. New sequence data are presented for four species: *N. elongata*, *N. multispora*, and *N. ramosa* and the new species *N. crenulata*. Our maximum likelihood and Bayesian analyses of combined 18S, 5.8S, and 28S subunits of nuc rDNA showed that *Nowakowskiella* is not a monophyletic clade because of the position of *Nowakowskiella elongata*, which is more related to *Cladochytrium*. We reclassify *N. elongata* as the type of a new genus, *Karlingiella*.

### ARTICLE HISTORY

Received 5 November 2018  
Accepted 26 February 2019

### KEYWORDS

Chytrid; phylogeny; 3 new taxa

## INTRODUCTION

Molecular phylogenetics have deeply influenced the systematics of several groups of fungi, and in the Chytridiomycota (chytrid fungi, or chytrids), DNA sequences, primarily of the nuc rDNA operon, have corroborated the relationships suggested by zoospore ultrastructure and have revealed that the classical taxonomic system, based on convergently derived thalli structures, is phylogenetically inaccurate (Letcher et al. 2006; Letcher and Powell 2014). Thus, numerous nomenclatural changes have been proposed, including the description of new species, genera, families, and orders (e.g., Letcher and Powell 2005; James et al. 2006; Letcher et al. 2006; Mozley-Standridge et al. 2009; Simmons et al. 2009; Longcore and Simmons 2012; Vélez et al. 2013; Karpov et al. 2014), and there have been major revisions and reclassifications of polyphyletic groups (e.g., Vélez et al. 2011; Letcher and Powell 2014).

The description of the Cladochytriales (Mozley-Standridge et al. 2009) segregated some genera classically included in Chytridiales based on molecular phylogenies of the partial 18S and 28S subunits of nuc rDNA. Additionally, of those species examined by transmission electron microscopy, all produce zoospores with a similar constellation of ultrastructural characters (Lucarotti 1981). Representatives of the order have different types of thallus development, reproductive structures, and ecological preferences. The polycentric genera

*Nowakowskiella* J. Schröt. and *Cladochytrium* Nowak. are the largest in the order, but only a few species have been isolated, cultured, and included in molecular phylogenies, keeping their interspecific relationships, and indeed the monophyly of the generic concept, uncertain.

*Nowakowskiella* was proposed by J. Schröter to include the type species *N. elegans*, previously named *Cladochytrium elegans* Nowak. (Schröter 1893). Several species have been described, and currently the genus contains 18 described species ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)), which are morphologically recognized by the production of polycentric thalli with operculate zoosporangia, interconnected by gradually attenuated hyphal branches called rhizomycelia that contain occasional, nonseptate swellings (Sparrow 1960; Karling 1977). Originally included in the Nowakowskiellaceae by Sparrow (1942), this genus was transferred shortly thereafter to Megachytriaceae (Sparrow 1943). Neither family was validly published (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plant [ICN], Art. 39.1; Turland et al. 2018), and Mozley-Standridge et al. (2009) later validated and reinstated the original Nowakowskiellaceae. Although families of the Cladochytriales have been reshuffled by Mozley-Standridge et al. (2009) based on molecular phylogenetics, the most recently described species, *N. keratinophila* Hassan and Batko, was published over 30 years ago (Hassan and Batko 1988), indicative of the lack of attention that this order has received.

During our work in Brazil, we found and cultured several species of *Nowakowskiella*, allowing a phylogenetic and morphological analysis to be performed. Considering this, we (i) describe the new species *N. crenulata* based on the distinctive morphology of the zoosporangia and resting spores, along with its phylogenetic placement; (ii) include *N. crenulata*, *N. elongata* Karling, *N. multispora* Karling, and *N. ramosa* Butler in phylogenetic analyses; (iii) transfer *N. elongata* to the new genus *Karlingiella*, based on its disparate phylogenetic position as sister to the Cladochytriaceae; and (iv) enhance knowledge about phylogenetic relationships within *Nowakowskiella* and the Cladochytriales.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolation and culture.**—We collected sediment surface, soil, and water samples from lentic and lotic freshwater habitats in several locations in the Brazilian Atlantic rainforest (TABLE 1) and baited samples with cellulosic substrates (onion skin, corn leaves, and cellophane) sterilized in ultraviolet light (2 h). Infected substrates were aseptically removed and placed on agar medium, on which chytrids were further isolated into pure culture by the collection of zoospores and/or rhizomycelium onto fresh media, including Peptonized Milk-Tryptone-Glucose (PmTG) with penicillin (Barr 1986; 1 g peptonized milk, 1 g tryptone, 5 g dextrose, 12 g agar, 0.1 g streptomycin sulfate, 0.1 g penicillin G, 1 L deionized

water), corn meal agar (CMA) plus glucose (16 g BD [Franklin Lakes, New Jersey] BL corn meal agar, 2.5 g glucose, 1 L deionized water), or yeast phosphate soluble starch (YPSS)/8 (Emerson 1958; 0.125 g yeast extract, 2.5 g soluble starch, 0.125 g  $K_2HPO_4$ , 0.062 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 12 g agar, 1 L deionized water). Pure cultures were deposited in the Coleção de Cultura de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica culture collection (CCIBt). Additionally, the strains were cryopreserved following the protocol of Boyle et al. (2003) and kept in  $-80$  C conditions in the CCIBt culture collection. The voucher numbers, localities, geographic coordinates, kinds of samples, and habitats collected are shown in TABLE 1.

*Nowakowskiella* species produce thick-walled resting spores that do not germinate on standard agar media, and these structures can be diagnostic for certain species. To stimulate resting spore production, we cultivated our *Nowakowskiella* strains on YPSS/8 medium prepared with soil water as described by Lucarotti (1981). We added 7 g of garden soil and 0.05 g calcium carbonate to 250 mL of distilled water ( $dH_2O$ ), steamed this mixture for 2 h on two consecutive days, and then filtered the solution twice with a Buchner funnel and Whatman No. 1 filter paper to remove all particulate material. After that, the solution was diluted in the ratio of two parts of  $dH_2O$  to 1 part of filtered solution, autoclaved, and used to prepare the YPSS/8 culture medium (Emerson 1958).

**Table 1.** Species, collection culture or voucher numbers, geographic coordinates, and types of samples and habitats collected for the 14 Cladochytriales strains isolated during this study.

Species	Collection culture or voucher number	Municipality in Sao Paulo State/Brazil	Geographic coordinates	Sample (habitat)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt 4014	Cananéia	25°03'05"/25°18'18"S, 47°53'48"/48°05'42"W	Water (stream)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt 3845	São Paulo	23°38'20.6"S, 46°37'34.3"W	Water (stream)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt 4263	Votorantim	23°25'33.72"S, 47°35'42.66"W	Water column (reservoir)
<i>Cladochytrium replicatum</i>	CCIBt 4390	Peruíbe	24°30'25.09"S, 47°15'42.08"W	Waterfall (stream)
<b><i>Nowakowskiella crenulata</i></b>	CCIBt 4258	Votorantim	23°34'49.92"S, 47°25'32.64"W	Sediment surface (reservoir)
<b><i>Nowakowskiella crenulata</i></b>	CCIBt 4259	Ibiúna	23°34'54.30"S, 47°26'12.12"W	Sediment surface (reservoir)
<b><i>Nowakowskiella elongata</i></b> (= <i>Karlingiella elongata</i> )	CCIBt 4016	Cananéia	25°03'05"/25°18'18"S, 47°53'48"/48°05'42"W	Water (stream)
<b><i>Nowakowskiella elongata</i></b> (= <i>Karlingiella elongata</i> )	ALJ09	Peruíbe	24°30'04.07"S, 47°15'58.0"W	Submerged leaves (river)
<i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i>	GHJ13	Cananéia	23°25'40.86"S, 47°35'31.14"W	Sediment surface (reservoir)
<b><i>Nowakowskiella multispora</i></b>	CCIBt 4015	Cananéia	25°03'05"/25°18'18"S, 47°53'48"/48°05'42"W	Water (stream)
<b><i>Nowakowskiella multispora</i></b>	CCIBt 3864	São Paulo	23°38'18.8"S, 46°37'31.7"W	Water (stream)
<b><i>Nowakowskiella ramosa</i></b>	CCIBt 4294	Votorantim	23°34'49.92"S, 47°25'32.64"W	Water column (reservoir)
<b><i>Nowakowskiella</i> sp. 1</b>	CCIBt 4260	Votorantim	23°34'58.56"S, 47°25'50.52"W	Sediment surface (reservoir)
<b><i>Nowakowskiella</i> sp.</b>	ALJ23	Pedro de Toledo	24°22'51.04"S, 47°20'39.0"W	Soil
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt 4017	Cananéia	25°03'05"/25°18'18"S, 47°53'48"/48°05'42"W	Soil
<i>Polychytrium aggregatum</i>	ALJ30	Iguape	24°32'28.1"S, 47°12'38.08"W	Water (river)

Note. The isolates highlighted in bold have never been cultured, sequenced, or included in phylogenetic analyses.



**Morphology.**—We observed the development of the strains on agar media (PmTG, CMA plus glucose, and/or YPSS/8) and colonized cellulosic substrates (onion skin, cellophane, and corn leaves). The type of development and the shapes and sizes of zoosporangia, resting spores, rhizomycelial swellings, and zoospores were examined using a Leica DMLB2 compound microscope and photographed with a Leica MC170 HD camera using Leica Qwin 3.1 software (Hessen, Wetzlar, Germany). We used the Sparrow (1960) and Karling (1977) monographs along with the original descriptions of the species (Butler 1907; Shanor 1942; Karling 1944, 1963) to identify our isolates.

**DNA extraction, amplification, and sequencing.**—

For DNA extraction, a small piece of agar with zoosporangia or rhizomycelium was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 mL of PmTG liquid medium prepared with autoclaved reverse-osmosis water. After incubation for 10–20 d at 21 C, the entire biomass was aspirated with a pipette and then transferred to 2 mL microfuge tubes. These tubes were centrifuged for 15 min at 13 000 rpm to remove excess culture medium, and the resulting pellet was used for DNA extraction. The extraction of genomic DNA followed the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, California). Genomic DNA was visualized by electrophoresis of the extracts on an 0.8% agarose gel. Ribosomal subunits were amplified with the polymerase chain reaction (PCR) SuperMix kit (Invitrogen) at a final volume of 25  $\mu$ L using the primer pairs (i) LR0R/LR5 (Vilgalys and Hester 1990) for partial 28S nuc rDNA; (ii) SR1R/NS4 (Vilgalys and Hester 1990) for 18S nuc rDNA; and (iii) ITS4/ITS5 (White et al. 1990) for complete internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2 = ITS) nuc rDNA. Thermocycling profiles followed cycles described by Marano et al. (2014). Amplicons were purified with the AxyPrep PCR Cleanup kit (Axygen, Corning, New York) or according to the protocol described by Schmitz and Riesner (2006). Sequencing was performed in an ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, California) at the Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo, Brazil.

**Phylogenetic analyses.**—For phylogenetic reconstruction, we selected 24 isolates of Cladochytriales (TABLE 2), which represent the major genera with sequences in GenBank; three *Polychytrium aggregatum* strains (CCIBt 4017, ALJ30, JEL109) were used as one outgroup. We included sequences derived from our 14 new Cladochytriales strains isolated from different habitats at

the Brazilian Atlantic rainforest (TABLES 1 and 2). The contiguous sequences were assembled using Sequencher 4.1.4 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan), and alignment was performed online using MAFFT 7.058 (Kato et al. 2017). The 18S, 5.8S, and 28S nuc rDNA sequences were concatenated through SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al. 2010), resulting in a final length of 2383 base pairs. The maximum likelihood (ML) analyses was conducted in GARLI 2.01 (Bazin et al. 2008) and Bayesian inference (BI) in MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) on the CIPRES Science Gateway platform (<https://phylo.org>), adding the partition models generated by jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). We performed the ML analysis with 1000 bootstrap replicates and the BI using the Markov chain Monte Carlo (MCMC) methodology to calculate posterior probabilities (PPs). The parameters for BI were 5 million generations, with the first 10% of iterations discarded as burn-in, then sampled every 1000th iterations from the remainder. Values <50% (ML) or <0.50 (BI) are omitted from the final tree. The character matrix (concatenated alignment), ML tree, and BI tree are deposited in TreeBASE (study TB2:S23854).

## RESULTS

We isolated 10 *Nowakowskiella* strains (TABLES 1 and 2), 6 of which were identified as described species and 2 as unknown species. The YPSS/8 soil medium was effective at stimulating resting spore production of *N. crenulata*, but the same was not observed with two unidentified strains, *Nowakowskiella* sp. 1 CCIBt 4260 and *Nowakowskiella* sp. ALJ23, which only produced zoosporangia. Because of this, we decided to restrict our identification of these two strains to the generic rank for now. Brief morphological comments, in addition to some pictures, are included below in consideration of the sparse information available for these taxa.

**Morphology.**—*Nowakowskiella ramosa* produces spherical to pyriform zoosporangia and resistant structures with a parenchymal region (Pr), which supports a single or as many as three resting spores with small incrustations in the wall (FIG. 1A–C). *Nowakowskiella hemisphaerospora* Shanor produces ovoid to pyriform zoosporangia (FIG. 1D) and septate resting spores, which form as two hemispheres, in which all contents migrate to one side, leaving the other side empty (FIG. 1E). *Nowakowskiella multisporea* produces subspherical to pyriform zoosporangia (FIG. 1F) and intercalary resistant structures, formed by consecutive and linked resting spores with a homogenous content (FIG. 1G). *Nowakowskiella* sp. ALJ23 (FIG. 1H–J) has spherical and pyriform

**Table 2.** Species, strains/vouchers, and GenBank accession numbers.

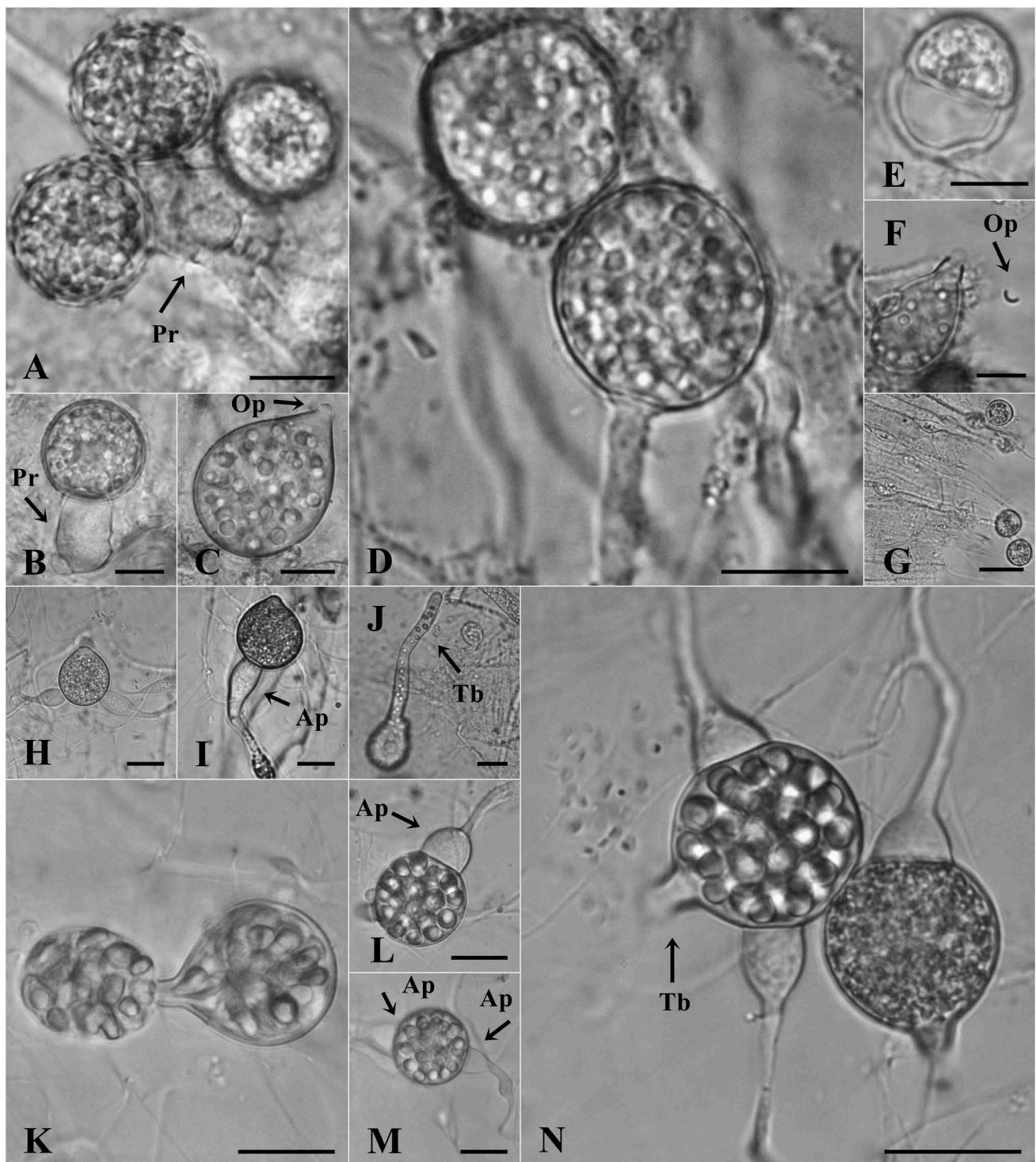
Taxon	Strain/voucher	GenBank accession number		
		SSU	ITS	LSU
<i>Allochytridium luteum</i>	ATCC 60989	JN940948	NA	AY439066
<i>Catenochytridium</i> sp.	JEL 145	EU828475	NA	EU828503
<i>Catenochytridium</i> sp.	JEL 044	EU828478	NA	EU828506
<b><i>Cladochytrium replicatum</i></b>	<b>CCIBt 4263</b>	<b>MH590084</b>	<b>MH590046</b>	<b>MH590071</b>
<i>Cladochytrium replicatum</i>	JEL 303	EU828461	NA	EU828488
<b><i>Cladochytrium replicatum</i></b>	<b>CCIBt 3845</b>	<b>MH590085</b>	<b>MH590047</b>	<b>MH590072</b>
<b><i>Cladochytrium replicatum</i></b>	<b>CCIBt 4390</b>	<b>MH590086</b>	<b>MH590048</b>	<b>MH590073</b>
<i>Cladochytrium replicatum</i>	JEL 180	NG017169	NA	NG027614
<i>Cladochytrium replicatum</i>	WJD 123	NA	NA	KC691378
<b><i>Cladochytrium replicatum</i></b>	<b>CCIBt 4014</b>	<b>KJ464414</b>	<b>NA</b>	<b>KJ464415</b>
<i>Cladochytrium</i> sp.	SMS 013	EU828459	NA	EU828486
<i>Cladochytrium</i> sp.	JEL 153	EU828458	NA	EU828485
<i>Cladochytrium</i> sp.	BR 696	JN940946	JN943816	JN941001
<i>Cylindrochytridium johnstonii</i>	JEL 596	JF796051	NA	JF796052
Endochytriaceae	JEL 072	EU828470	NA	EU828497
<i>Endochytrium ramosum</i>	JEL 402	EU828484	NA	EU828513
<i>Endochytrium</i> sp.	JEL 324	AY635844	AY997044	DQ273816
<i>Nephrochytrium</i> sp.	JEL 125	AH009049	NA	EU828511
<i>Nowakowskiella elegans</i>	M 29	NA	AY353257	AY349080
<i>Nowakowskiella elegans</i>	JEL 046	EU828463	NA	EU828490
<i>Nowakowskiella elegans</i>	UCB 50 1	EU828464	NA	EU828491
<i>Nowakowskiella elegans</i>	JEL 157	EU828465	NA	EU828492
<b><i>Nowakowskiella elongata</i> (= <i>Karlingiella elongata</i>)</b>	<b>CCIBt 4016</b>	<b>MH590087</b>	<b>MH590049</b>	<b>MH590074</b>
<b><i>Nowakowskiella elongata</i> (= <i>Karlingiella elongata</i>)</b>	<b>ALJ 09</b>	<b>NA</b>	<b>MH590050</b>	<b>MH590075</b>
<b><i>Nowakowskiella hemisphaerospora</i></b>	<b>GHJ 13</b>	<b>MH590088</b>	<b>MH590051</b>	<b>MH590076</b>
<b><i>Nowakowskiella multispora</i></b>	<b>CCIBt 3864</b>	<b>MH590089</b>	<b>MH590052</b>	<b>MH590077</b>
<b><i>Nowakowskiella multispora</i></b>	<b>CCIBt 4015</b>	<b>KJ539147</b>	<b>KJ539148</b>	<b>KJ539149</b>
<b><i>Nowakowskiella ramosa</i></b>	<b>CCIBt 4294</b>	<b>MH590090</b>	<b>NA</b>	<b>MH590078</b>
<b><i>Nowakowskiella</i> sp.</b>	<b>ALJ 23</b>	<b>MH590091</b>	<b>MH590053</b>	<b>MH590079</b>
<i>Nowakowskiella elegans</i>	JEL 127	EU828466	NA	DQ273798
<i>Nowakowskiella</i> sp.	JH HBR	EU828469	NA	EU828496
<i>Nowakowskiella</i> sp.	JH CC2	EU828481	NA	EU828509
<i>Nowakowskiella</i> sp.	JH SA	EU828482	NA	EU828510
<b><i>Nowakowskiella crenulata</i></b>	<b>CCIBt 4258</b>	<b>MH590092</b>	<b>MH590054</b>	<b>MH590080</b>
<b><i>Nowakowskiella crenulata</i></b>	<b>CCIBt 4259</b>	<b>MH590093</b>	<b>MH590055</b>	<b>MH590081</b>
<b><i>Nowakowskiella</i> sp. 1</b>	<b>CCIBt 4260</b>	<b>MH590094</b>	<b>MH590056</b>	<b>MH590082</b>
<i>Polychytrium aggregatum</i>	JEL 109	NG017168	AY997074	AY349084
<i>Polychytrium aggregatum</i>	ALJ 30	MH590095	MH590057	MH590083
<i>Polychytrium aggregatum</i>	CCIBt 4017	KJ464408	KJ464409	KJ464410
<i>Septochytrium</i> sp.	JEL 177	EU828474	NA	EU828502
<i>Septochytrium variabile</i>	JEL 191	EU828483	NA	EU828512

Note. The taxa highlighted in bold represent the strains isolated during this study.

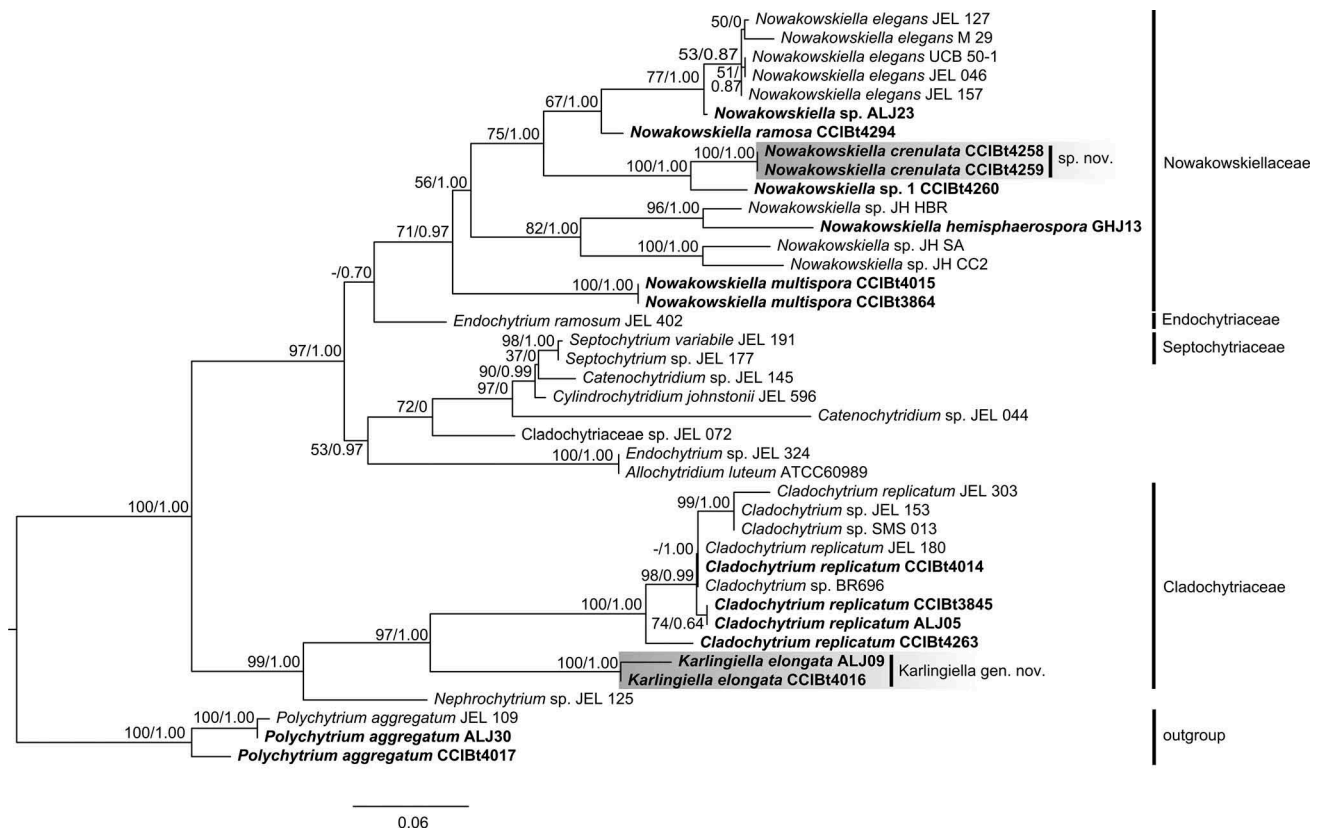
zoosporangia, which are supported by terminal or intercalary spherical apophysis (FIG. 1H–I). The zoosporangia produce a long discharge tube (FIG. 1J), and zoospores contain a single, hyaline lipid globule. Resting spores were not observed. *Nowakowskiella* sp. 1 CCIBt 4260 (FIG. 1K–N) forms intercalary or terminal zoosporangia, which are commonly spherical, subspherical, or pyriform (FIG. 1K–N), with a small discharge tube (FIG. 1N). Additionally, zoosporangia are subtended by prominent apophyses, which are produced on both sides of zoosporangia when development is intercalary (FIG. 1M). The zoospores have a single, hyaline lipid globule and are released in a membrane-bound mass (FIG. 1K), in which the zoospores remain immobile for a short period before becoming mobile and rupturing the binding membrane. The new species *N. crenulata* (FIG. 3) produces spherical and subspherical zoosporangia (FIG. 3C–E) with an operculum at the apex (FIG. 3E). The apophyses are prominent and clavate

(FIG. 3C, D), and the resting spore produces singular crenulated ornamentations in the wall (FIG. 3J). Additionally, the branch that supports the resting spore is septate (FIG. 3H). The zoospores produce a single and hyaline lipid globule (FIG. 3B).

**Phylogenetic analyses.**—The combined sequence data (18S, 5.8S, and 28S of the nuc rDNA) had 2383 characters, with 1343 parsimony-informative sites. jModelTest indicated the most appropriate models of DNA substitution were TrNef+I (18S), TPM1uf+G (5.8S), and TIM3ef+I+G (28S), according to Akaike information criterion (AIC). The phylogenetic reconstruction contains two strongly supported clades that represent the Nowakowskiellaceae and Cladochytriaceae families proposed by Mozley-Standridge et al. (2009), although internal configurations and support values for these families were altered (FIG. 2). In the



**Figure 1.** Zoosporangia and resting spores morphology of *Nowakowskiella ramosa*, *N. hemisphaerospora*, *N. multispora*, *Nowakowskiella* sp. 1 CCIBt 4260, and *Nowakowskiella* sp. ALJ23. A–C. *Nowakowskiella ramosa* CCIBt 4294. A–B. Ornamented resting spores with a parenchymal region (Pr). C. Operculate (Op) zoosporangia. D–E. *Nowakowskiella hemisphaerospora* GHJ13. D. Spherical zoosporangia. E. Septate resting spores. F–G. *Nowakowskiella multispora* CCIBt 4015. F. Operculate (Op) zoosporangia. G. Resting spores. H–J. *Nowakowskiella* sp. ALJ23. H. Intercalary apophysate zoosporangium. I. Terminal apophysate (Ap) zoosporangium. J. Zoosporangium with a long discharge tube (Tb). K–N. *Nowakowskiella* sp. 1 CCIBt 4260. K. Zoospore discharge. L. Terminal apophysate (Ap) zoosporangium. M. Intercalary apophysate (Ap) zoosporangia. N. Mature and immature intercalary zoosporangia with a discharge tube (Tb). Ap = apophysis; Op = operculum; Pr = parenchymal region; Tb = discharge tube. Bars = 10  $\mu$ m.



**Figure 2.** Phylogram inferred from maximum likelihood (ML) analysis of 37 ingroup isolates in Cladochytriales order based on combined (SSU+5.8S+LSU) sequences data. Maximum likelihood bootstrap support values <50% are indicated with (-). Bayesian posterior probability values >0.50 are labeled numerically. The clades that were not recovered in the Bayesian tree are indicated with (0). The bar indicates the number of substitutions per site. Strains highlighted in bold were isolated during this study, and those highlighted in gray represent the taxonomic novelties.

Nowakowskiellaceae, *N. ramosa* and *Nowakowskiella* sp. (ALJ23) are included in a supported clade with the type species, *N. elegans*, and the new species *N. crenulata* and *Nowakowskiella* sp. 1 (CCIBt 4260). *N. hemisphaerospora*, along with undescribed species, is sister to this clade. *Nowakowskiella multispora* is a basal lineage within the genus. Finally, the phylogenetic placement of our *N. elongata* strains indicates that this species is not related to the monophyletic genus, and considering that, we transfer the species to a new genus *Karlingiella*, within Cladochytriaceae.

## TAXONOMY

***Nowakowskiella crenulata*** G.H. Jerônimo & C.L.A. Pires-Zottarelli, sp. nov. FIG. 3A–J

Mycobank MB829117

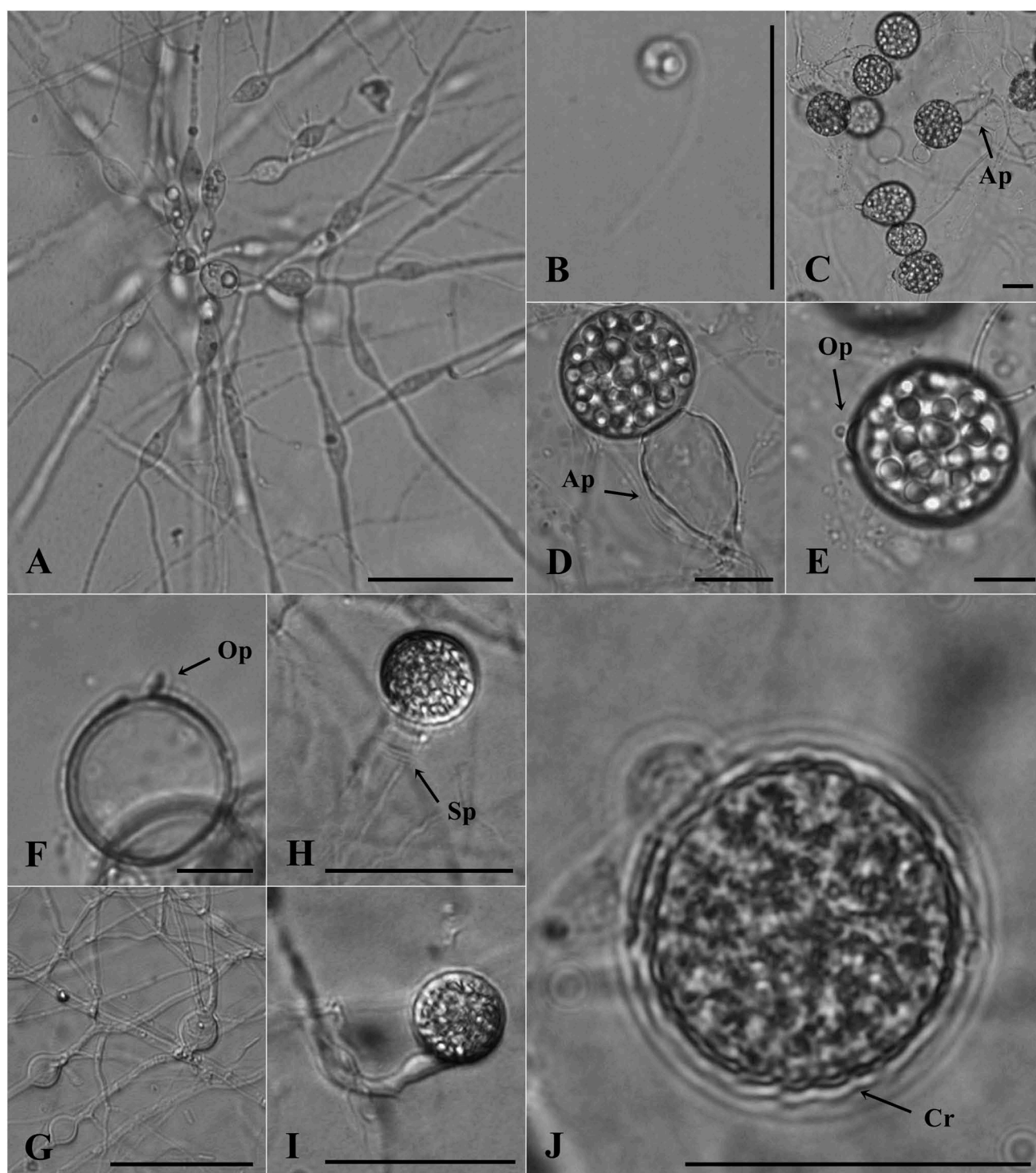
**Typification:** BRAZIL. SÃO PAULO: Votorantim, Santa Helena reservoir, 23°34'54.30"S, 47°26'12.12"W, from sediment samples baited with onion skin and corn leaves, 20 Mar 2014. **Holotype** (FIG. 3A–J). Diagnosis based on CCIBt 4258. **Ex-type**, G.H. Jerônimo CCIBt

4258. GenBank (CCIBt 4258): 18S = MH590092; ITS = MH590054; LSU = MH590080.

**Other material examined:** BRAZIL. SÃO PAULO: Ibiúna, Itupararanga reservoir, 23°34'54.30"S, 47°26'12.12"W, from sediment samples baited with onion skin and corn leaves, 20 Mar 2014. CCIBt 4259. GenBank (CCIBt 4259): SSU = MH590093; ITS = MH590055; LSU = MH590081.

**Etymology:** From *crenulatus* (Latin), referring to the morphology of the resting spores, which have small crenulated invaginations in their walls.

Fungus saprophytic. Polycentric rhizoidal system, branched, profuse, with numerous nonseptate swellings, broadly fusiform, 4.5–5 × 3–4.5 µm, or spherical and 3–5 µm. Zoosporangia terminal, occasionally intercalary, hyaline, smooth, spherical, 20–23 µm, subspherical, 19–24 × 20–27 µm, or ovoid, 21–25 × 23–30 µm, usually apophysate, without a discharge tube; operculum smooth, wall thin, smooth, colorless. Apophysis clavate, 10–25 × 5–12 µm, or nearly spherical, 10–14 µm. Zoospores spherical, 2–3 µm diam, with a single, hyaline lipid globule. Resting spores spherical, 7–7.5 µm, or subspherical and 7–7.5 × 7–7.5 µm



**Figure 3.** Morphology of *Nowakowskiella crenulata* CCIBt 4258 on onion skin and YPSS/8 broth. A. Early development stages in YPSS/8 broth. B. Encysted zoospores in YPSS/8. C–D. Zoosporangia and prominent clavate apophysis (Ap) on onion skin. E–F. Operculate zoosporangia (Op) on onion skin. G. Rhizomycelium with nonseptate swellings in YPSS/8 broth. H–J. Crenulate resting spores with a delimiting septum (Sp) in YPSS/8. Ap = apophysis; Op = operculum; Sp = septum; Cr = crenulated ornamentations. Bars = 10  $\mu$ m.

diam, ornate with crenulated invaginations in the wall, supported by a septate branch.

*Notes:* The strains CCIBt 4258 and CCIBt 4259 grow indeterminately on PmTG, CMA plus glucose, and

even on YPSS/8, but resting spores were only observed in YPSS/8 broth. Both strains were isolated from sediment surface samples collected from an oligotrophic (“Santa Helena”: 23°34′49.92″S, 47°25′32.64″W) and

a mesotrophic (“Itupararanga”: 23°34′54.30″S, 47°26′12.12″W) reservoir. We were also able to bait a third strain from sediment samples of an eutrophic reservoir (“Hedberg”: 23°25′40.86″S, 47°35′31.04″W) but were unable to isolate a culture from the colonized bait. The finding of *N. crenulata* from sediment samples of reservoirs with different trophic states (oligotrophic, mesotrophic, and eutrophic) indicates that this species can survive in a wide range of limnological conditions.

***Karlingiella*** Jerônimo, Jesus & Pires-Zottarelli, gen. nov.


Mycobank MB829118

*Typification:* *Karlingiella elongata* (Karling) Jerônimo, Jesus & Pires-Zottarelli.

*Etymology:* The prefix of the genus name honors the researcher John S. Karling, who originally described this species, and several other *Nowakowskiella* species after a visit to the Brazilian Amazon rainforest.

Fungus saprophytic. Polycentric rhizoidal system, branched, profuse, with numerous nonseptate swellings. Operculate zoosporangia, terminal or intercalary, elongate, cylindrical or globose, frequently producing a parenchymal basal region. Zoospores spherical, with a single, hyaline lipid globule. Resting spores intercalary, spherical or oval, hyaline, containing a large refractive globule. The genus is sister to the Cladochytriaceae in molecular phylogeny of the combined nuc rDNA genes.

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

***Karlingiella elongata*** (Karling) Jerônimo, Jesus & Pires-Zottarelli, comb. nov.  FIG. 4A–I

Mycobank MB829121

*Basionym:* *Nowakowskiella elongata* Karling, Bull Torrey Bot Club 71:375. 1944.

*Typification:* Karling (1944) did not designate a type in the original description. Figures 30–44 from the original description (Karling 1944) are designated here as **lectotype**, MBT 386057 (ICN, Art. F.5.4).

*Specimens examined:* BRAZIL. SÃO PAULO: Cananéia, Ilha do Cardoso, 25°03′05″/25°18′18″S, 47°53′48″/48°05′42″W, soil sample from an Atlantic rainforest area, baited with onion skin and corn leaves, 6 Nov 2012, G.H. Jerônimo CCIBt 4016. GenBank: 18S = MH590087; ITS = MH590049; 28S = MH590074. Peruíbe, Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, 24°30′04.07″S, 47°15′58.0″W, from submerged leaves samples in an Atlantic rainforest stream, baited with onion skin and corn leaves, 24 Aug 2016, A.L. Jesus ALJ09. GenBank: ITS = MH590050; 28S = MH590075.

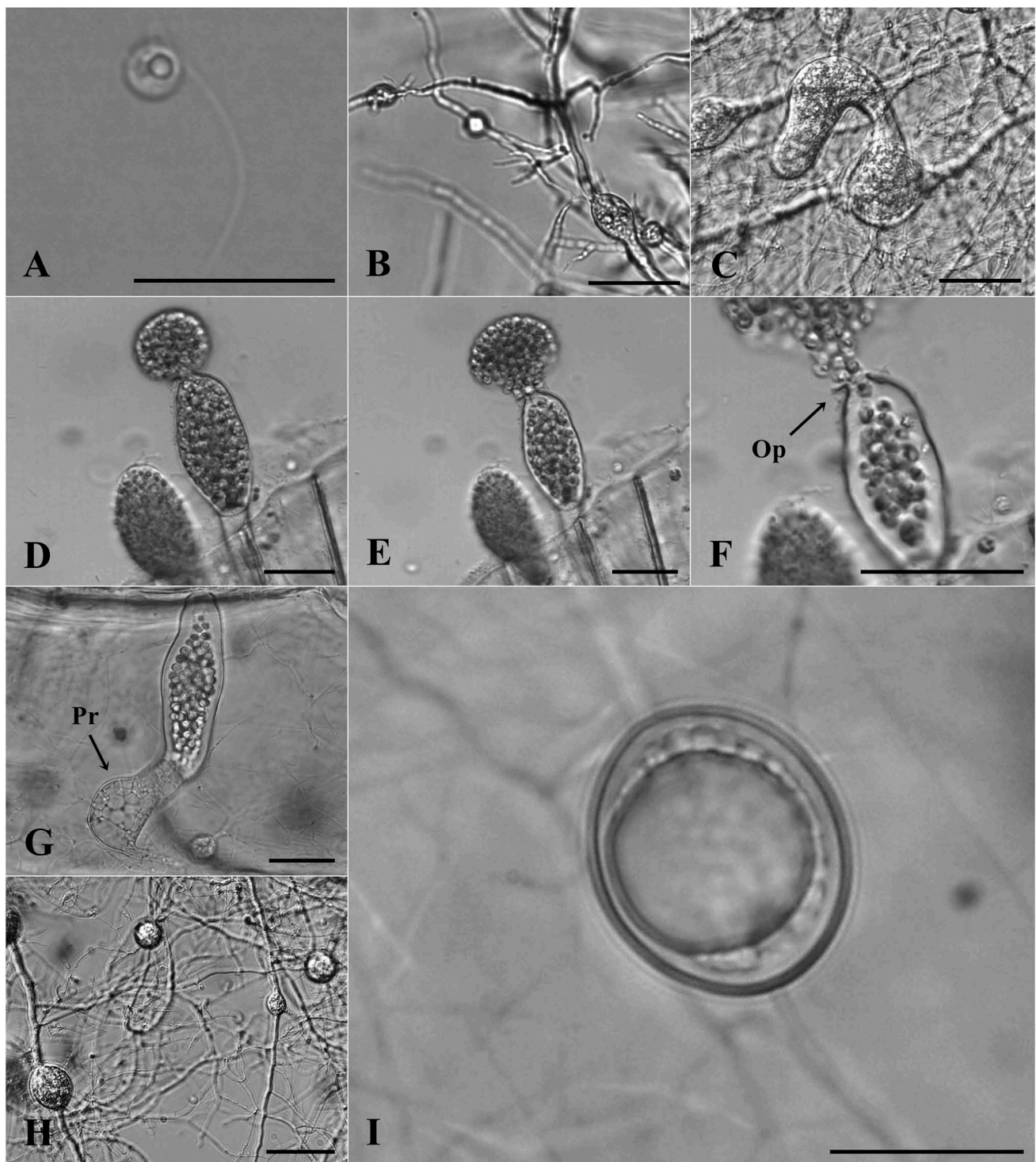
*Notes:* The morphologies of our isolates (CCIBt 4016, ALJ09) fit Karling’s (1944) description of

*N. elongata*, with no additional or contradictory characters. The polycentric thalli produce zoosporangia that are elongate, 25–85 × 10–33 μm, and operculate and frequently with a parenchymal basal region. Resting spores are hyaline and commonly spherical, 16.5–33 μm, or oval and 20–25 × 18–23 μm with a large refractive globule surrounded by several smaller droplets. These strains grow indeterminately on PmTG, CMA plus glucose, or even YPSS/8 media. On agar media, cultures are predominantly rhizomycelial, but zoosporangia and resting spores are produced occasionally. The elongated or cylindrical zoosporangia were most commonly observed on cellulosic baits (onion skin and corn leaves) rather than on culture media.

## DISCUSSION

Our phylogeny represents the largest analysis of *Nowakowskiella* to date and provides a phylogenetic backbone for the interspecific relationships within *Nowakowskiella*. Branch lengths are long, and support values are low, leaving the definitive phylogeny unknown until additional cultures can be examined. However, the inclusion of *N. crenulata*, *N. ramosa*, *N. multispora*, and *N. elongata* makes an important contribution to understanding the relationships of the species of this genus (FIG. 2). By the inclusion of these species in a molecular phylogeny, we have shown that (i) *N. ramosa* is sister to the type species *N. elegans*; (ii) *N. multispora* represents the basal lineage in the genus; (iii) *N. elongata* is within the Cladochytriaceae on a supported, basal lineage, justifying its placement into the new genus *Karlingiella*; and (iv) there is genetic variation within described species of the Cladochytriales, suggesting possible cryptic species, and genetic evidence for additional undescribed species that warrant further study of thallus and zoospore morphologies.

The strains that we isolated in Brazil contribute to enhancing our understanding of some convergent characters traditionally used in the classical taxonomy of these chytrids. In particular, the phylogenetic placement of *Karlingiella* as a sister group of *Cladochytrium* and *Nephrochytrium* sp. JEL 125 indicates that morphological characters such as operculation, thallus development, and rhizomycelial swellings septation are insufficient to determine the identification of these fungi at the genus level. The phylogenetic placement of *Karlingiella* suggests that the turbinate cells, characteristic of *Cladochytrium*, could be derived from nonseptate swellings observed in *Karlingiella*. The sharing of some morphological characters previously thought to be characteristic of specific genera, such as the turbinate cells in *Cladochytrium* in the Cladochytriales and



**Figure 4.** Morphology of *Karlingiella elongata*. A. Zoospores, each with a single hyaline lipid globule. B. Zoosporangia and rhizomycelium on PmTG medium. C. Intercalary zoosporangia with elongate tube in YPSS/8. D–F. Zoosporangium in onion skin releasing zoospores and operculum (Op). G. Zoosporangium with a parenchymal basal region (Pr) in onion skin. H. Rhizomycelium and nonseptate swellings on PmTG agar. I. Resting spores with a large lipid globule surrounded by small droplets in PmTG. Op = operculum; Pr = parenchymal region. Bars = 10 $\mu$ m.

the recently described *Zopfochytrium* (Powell et al. 2018) in the Chytridiales, indicates that DNA sequence data should be given priority when assigning taxa to these morphologically convergent groups.

The description of the new species *Nowakowskiella crenulata* represents the first new *Nowakowskiella* species since Hassan and Batko (1988) described *N. keratinophila* from Poland. The delimitation and classification of

*N. crenulata* as a new species is based on its singular morphology and its separate, supported phylogenetic lineage, whereas the new genus *Karlingiella* and new combination *Karlingiella elongata* are based on the unexpected disparate phylogenetic placement of *N. elongata* as sister group of the Cladochytriaceae. Future studies focusing on zoospore ultrastructure and DNA sequence data are necessary in order to further justify additional taxa and produce a better-resolved phylogeny of the Cladochytriales.

The genus *Nowakowskiella* is distributed worldwide (Sparrow 1960; Karling 1977; Lucarotti 1981; Hassan 1983; Hassan and Batko 1988; Czczuga and Muszynska 1999; Marano et al. 2007, 2008; Nascimento and Pires-Zottarelli 2009; Godlewska et al. 2013; Jesus et al. 2013; Muszynska et al. 2014; Jerônimo et al. 2015). In Brazil, this genus is frequently reported from soil and water samples (Pires-Zottarelli and Gomes 2007; Jesus et al. 2013; Jerônimo et al. 2015), presenting high frequency of occurrence and abundance. *Karlingiella elongata* (as *N. elongata*) was reported from several locations in Atlantic and Amazon Brazilian rainforests (Karling 1944, 1945; Nascimento and Pires-Zottarelli 2009; Jesus et al. 2013; Jerônimo et al. 2015). It has been a common species baited from freshwater ecosystems (Nascimento and Pires-Zottarelli 2009; Jesus et al. 2013; Jerônimo et al. 2015). Furthermore, some species such as *N. granulata*, *N. macrospora*, and *Karlingiella elongata* were originally described from Brazil (Karling 1944, 1945), suggesting that the country could represent a rewarding region to focus future studies of the order's biodiversity and molecular systematics.

## ACKNOWLEDGMENTS

Lucas Michelotti, Denise C. Bicudo, Samantha B. Faustino, Elaine C.R. Bartozek, Stefano Zorzal de Almeida, and Maria A. P. C. da Silva (Dorinha) are recognized for their contribution collecting samples or laboratory support, and we thank Instituto Florestal and Grupo Votorantim for the permission to collect samples.

## FUNDING

This study was supported by Fapesp (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) through scholarships awarded to G. H. Jerônimo (nos. 2014/16358-4 and 2016/25800-6; BEPE) and A. L. Jesus (no. 2016/00697-0) and projects to C. L. A. Pires-Zottarelli (nos. 2012/50222-7 and 2016/11146-4). We are indebted to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), which supported G. H. Jerônimo during his PhD research. Work in the laboratory of T.Y.J. was funded by NSF grant DEB-1354625.

Additionally, we thank the thematic Acquaesed project (FAPESP no. 2009/53898-9) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity fellowship awarded to C. L. A. Pires Zottarelli (no. 304493/2015-5).

## ORCID

Gustavo H. Jerônimo  <http://orcid.org/0000-0002-0906-337X>

D. Rabern Simmons  <http://orcid.org/0000-0002-7033-225X>

Timothy Y. James  <http://orcid.org/0000-0002-1123-5986>

## LITERATURE CITED

- Barr DJS. 1986. *Allochytrium expandens* rediscovered: morphology, physiology and zoospore ultrastructure. *Mycologia* 78:439–448.
- Bazinet AL, Cummings MO. 2008. The lattice project: a grid research and production environment combining multiple grid computing models. In: Weber MHW, ed. Distributed & grid supporting communities. Marburg, Germany: [Rechenkraft.net](http://Rechenkraft.net). p. 2–13.
- Boyle DG, Hyatt AD, Daszak P, Berger L, Longcore JE, Porter D, Hengstberger SG, Olsen V. 2003. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:59–64.
- Butler EJ. 1907. An account of the genus *Pythium* and some Chytridiaceae. *Memoirs of the Department of Agriculture India, Botanical Series* 1:1–160.
- Czczuga B, Muszynska E. 1999. Aquatic fungi growing on percid fish egg (Percidae) in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* 8:31–34.
- Emerson R. 1958. Mycological organization. *Mycologia* 50:589–621.
- Godlewska A, Kiziewicz B, Muszynska E, Milewski R. 2013. Aquatic fungi and straminipilous organisms in lakes of the Augustowska Primeval Forest, Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 42:451–459.
- Hassan SKM. 1983. *Nowakowskiella moubasheriana* sp. nov., a new cladochytriod fungus from Poland. *Acta Mycologica* 19:77–82.
- Hassan SKM, Batko A. 1988. *Nowakowskiella keratinophila* sp. nov. a keratinophilic fungus from the brackish water. *Acta Mycologica Warszawa* 22:193–198.
- James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R. 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98:860–871.
- Jerônimo GH, Jesus AL, Marano AV, James TY, de Souza JL, Rocha SCO, Pires-Zottarelli CLA. 2015. Diversidade de Blastocladiomycota e Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Brasil. *Hoehnea* 42:135–163.
- Jesus AL, Marano AV, Schoenlein-Crusius IH, Pires-Zottarelli CLA. 2013. Diversidade de organismos zoospóricos



- heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40:167–180.
- Karling JS. 1944. Brazilian chytrids. I. Species of *Nowakowskiella*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 71:374–389.
- Karling JS. 1945. Brazilian chytrids. V. *Nowakowskiella macrospora* n. sp., and other polycentric species. *American Journal of Botany* 32:29–35.
- Karling JS. 1963. Indian chytrids. IV. *Nowakowskiella multisporea* sp. nov. and other polycentric species. *Sydowia* 17:314–319.
- Karling JS. 1977. Chytridiomycetorum Iconographia. Monticello, New York: Lubrecht-Cramer. 414 p.
- Karpov SA, Kobseva AA, Mamkaeva MA, Mamkaeva KA, Mikhailov KV, Mirzaeva GS, Aleoshin VV. 2014. *Gromochytrium mamkaevae* gen & sp. nov. and two new orders: Gromochytriales and Mesochytriales (Chytridiomycetes). *Persoonia* 32:115–126.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* bbx108.
- Letcher PM, Powell MJ. 2005. *Kappamyces*, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). *Nova Hedwigia* 80:115–133.
- Letcher PM, Powell MJ. 2014. Hypothesized evolutionary trends in zoospore ultrastructural characters in Chytridiales (Chytridiomycota). *Mycologia* 106:379–396.
- Letcher PM, Powell MJ, Churchill PF, Chamber JG. 2006. Ultrastructural and molecular delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110:898–915.
- Longcore JE, Simmons DR. 2012. The Polychytriales ord. nov. contains chitinophilic members of the rhizophlyctoid alliance. *Mycologia* 104:276–294.
- Lucarotti CJ. 1981. Zoospore ultrastructure of *Nowakowskiella elegans* and *Cladochytrium replicatum* (Chytridiales). *Canadian Journal of Botany* 59:137–148.
- Marano AV, Jesus AL, de Souza JI, Leão EM, James TY, Jerônimo GH, de Cock AWAM, Pires-Zottarelli CLA. 2014. A new combination in *Phytophythium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5:510–522.
- Marano AV, Steciow MM, Arellano ML, Arambarri AM, Sierra MV. 2007. El género *Nowakowskiella* (Cladochytriales, Chytridiomycota) em ambientes de la Pcia. De Buenos Aires (Argentina): taxonomía y abundancia de las especies encontradas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 42:13–24.
- Marano AV, Steciow MM, Barrera MD, Donadelli JL, Saparrat MCN. 2008. Frequency, abundance and distribution of zoosporic organisms from Las Cañas (Buenos Aires, Argentina). *Mycologia* 100:691–700.
- Mozley-Standridge SE, Letcher PM, Longcore JE, Porter D, Simmons DR. 2009. Cladochytriales—a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research* 113:498–507.
- Muszynska E, Kiziewicz B, Godlewska A, Milewski R. 2014. Fungi and Straminipilous organisms growing in the Narew River and its chosen tributaries in NE Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* 23:401–408.
- Nascimento CA, Pires-Zottarelli CLA. 2009. Chytriales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 23:459–473.
- Pires-Zottarelli CLA, Gomes AL. 2007. Contribution to the knowledge of the Chytridiomycota from the “Reserva Biológica de Paranapiacaba” Santo André, State of São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica* 7:309–329.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2:1253–1256.
- Powell MJ, Letcher PM, Longcore JE, Blackwell WH. 2018. *Zopfochytrium* is a new genus in the Chytridiales with distinct zoospore ultrastructure. *Fungal Biology* 122:1041–1049.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across large model space. *Systematic Biology* 61:539–542.
- Schmitz A, Riesner D. 2006. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* 354:311–313.
- Schröter J. 1893. Phycomycetes. In: Engler A, Prantl K, eds. *Natürlichen Pflanzenfamilien*. Vol. 1. Leipzig: W. Englemann. p. 63–141.
- Shanor L. 1942. A new fungus belonging to the Cladochytriaceae. *American Journal of Botany* 29:174–179.
- Simmons DR, James TY, Meyer AF, Longcore JE. 2009. Lobulomycetales, a new order in the Chytridiomycota. *Mycological Research* 113:450–460.
- Sparrow FK. 1942. A classification of aquatic phycomycetes. *Mycologia* 34:113–116.
- Sparrow FK. 1943. Aquatic phycomycetes. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press. 785 p.
- Sparrow FK. 1960. Aquatic phycomycetes. 2nd ed. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press. 1187 p.
- Turland NJ, Wiersema JH, Barrie FR, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Kusber WH, Li DZ, Marhold K, May TW, McNeill J, Monro AM, Prado J, Price MJ, Smith GF. 2018. International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (shenzhen code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen. *Regnum Vegetabile*. 159:1–254.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27:171–180.
- Vélez CG, Letcher PM, Schultz S, Mataloni G, Lefevre E, Powell MJ. 2013. Three new genera from aquatic habitats in Argentina. *Mycologia* 105:1251–1265.
- Vélez CG, Letcher PM, Schultz S, Powell MJ, Churchill PF. 2011. Molecular phylogenetic and zoospore ultrastructural analyses of *Chytridium olla* establish the limits of a monophyletic Chytridiales. *Mycologia* 103:118–130.
- Vilgalys R, Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238–4246.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. New York: Academic Press. p. 315–322.