

LOISE ARAUJO COSTA

**COMUNIDADES DE FUNGOS EM FOLHEDO DA MATA ATLÂNTICA NA
REGIÃO SEMIÁRIDA DO BRASIL**

FEIRA DE SANTANA - BA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**COMUNIDADES DE FUNGOS EM FOLHEDO DA MATA ATLÂNTICA NA
REGIÃO SEMIÁRIDA DO BRASIL**

LOISE ARAUJO COSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão (UEFS)

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Costa, Loise Araujo
C873c Comunidades de fungos em folhedo da Mata Atlântica na região
semiárida do Brasil / Loise Araujo Costa. – Feira de Santana, 2014.
131 f. : il.

Orientador: Luis Fernando Pascholati Gusmão.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2014.

1. Fungos – Mata Atlântica. 2. Semiárido – Brasil. I. Gusmão, Luis
Fernando Pascholati, orient. II. Universidade Estadual de Feira de
Santana. III. Título.

CDU: 582.28(253)(81)


BANCA EXAMINADORA

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

(Universidade Federal de Lavra/UFLA)



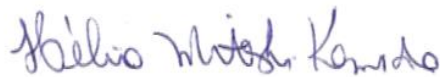
Prof. Dr. André Rodrigues

(Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita/UNESP)



Prof. Dr. Marcos Fábio Oliveira Marques

(Universidade do Estado da Bahia/ UNEB)



Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida

(Universidade Estadual de Feira de Santana/UEFS)



Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão

(Universidade Estadual de Feira de Santana/UEFS)

Orientador e Presidente da Banca

À minha filha, Ana Isabella, fonte de inspiração para novas conquistas. Aos meus pais, Newton Martins Costa e Antônia Araujo Costa, espelhos de sabedoria, moral e dedicação incondicional.

*“Rather than being on the margins (of an ecosystem), fungi are...
central to it, interconnecting and influencing the lives and deaths of
plants and animals in countless, diverse and often surprising ways.
To disregard them is to misunderstand the system”*

Rayner (1993)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Feira de Santana.

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos funcionários, Adriana Estrela e Gardênia Aires, e professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica.

Ao professor Luís Fernando P. Gusmão, pela orientação, apoio, confiança e incentivo.

Ao SISBIO, pela autorização do trabalho nas unidades de conservação.

A Francisco Humberto Bezerra, gestor do Parque Nacional de Ubajara-PARNA (CE), pelo apoio ao trabalho e contribuição com informações do parque.

Aos guias Daniel, do PARNA, e Thiago, da Reserva Mata Pau-Ferro (PB), pelo auxílio nas coletas e ajuda no reconhecimento das plantas.

À Maria Teresa, bióloga da Reserva Jequitibá, pelo envio dos dados de precipitação da Serra da Jibóia.

Aos laboratórios da UEFS: Didático, LAC, LAFICO, LAMOL, LAPEM e LASIS, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Ludwig H. Pfenning e Lucas Magalhães de Abreu da Universidade Federal de Lavras pelo auxílio na caracterização dos fungos do grupo dos celomicetos; e aos funcionários Edson Rezende e Miriam Salgado pela ajuda na identificação e disposição de todo o material necessário.

À Cristina Maria Mota da Micoteca URM, Universidade Federal de Pernambuco, pela identificação dos isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Ao Dr. Rafael Castañeda-Ruiz, pelo auxílio na identificação dos fungos.

Ao Dr. Gerald Bills pelo envio de artigos científicos sobre ecologia de fungos.

Ao Prof. Paulo Enrique Peixoto pela ajuda e apoio na realização das análises estatísticas.

À família Lamic, pelo grande e fundamental apoio na realização do trabalho e pelos momentos descontraídos: Alisson, Carol Azevedo, Carol Ribeiro, Davi, Flávia, Jorge, Josiane, Lara, Marcos, Myrna, Natália, Patrícia, Sheila, Silvana, Luís Antônio (como agregado), Tasciano, Taimy e Tiago; à Íthala e Taiana pela valiosa ajuda na execução do trabalho; e à Damile pelo auxílio na identificação dos fungos.

Aos amigos da Pós-Graduação em Botânica em especial à Eloina, Grênivel, Tiago e Tasciano pelas discussões e reuniões de estudos sobre estatística multivariada.

Aos grandes amigos Ana Paula, Alan, Aline, Carolina Lima, Eloína, Fábio, Leonardo, Mona Lisa, Priscila, Paulo Ricardo e Rita de Cássia pela amizade, força e o carinho de sempre.

Às amigas Ana Karla, Gláucia e Kedma, da Universidade Federal de Lavras, por toda a ajuda nos momentos que necessitei.

Ao amigo Braz Júnior pela paciência em tirar as minhas dúvidas e valiosa discussão sobre os índices de diversidade, mesmo à distância.

À funcionária Goreth, aos biólogos Kátia Brito e Ricardo Vilas-Boas pelo grande apoio e socorro nos momentos que necessitei.

Aos meus pais, Antônia e Newton; irmãos Laécio, Leonardo e Luciano; cunhadas e sobrinhos Dan, Leozinho e o pequeno Davi, pelo amor, apoio, força e por se fazerem presentes constantemente em minha vida.

À minha filha Ana Isabella por ser a luz e grande incentivo da minha vida e por compreender, mesmo ainda pequena, a minha ausência em alguns momentos.

Aos familiares Andréia, Dailson Júnior, Lú, Nina, Gláucia e Fabiana pelos momentos agradáveis e divertidos; e a todos os outros familiares e amigos que se fizeram presentes mesmo à distância.

A Deus, acima de tudo, pelo seu imenso amor e por permitir concluir esta etapa da minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A Mata Atlântica.....	4
2.2 A região semiárida brasileira e os remanescentes de Mata Atlântica	7
2.3 <i>Clusia nemorosa</i> e <i>Vismia guianensis</i> : distribuição e caracterização.....	10
2.4 Os fungos: classificação, caracterização e diversidade.....	12
2.5 Fungos associados à serapilheira.....	13
2.6 Diversidade de fungos sapróbios em florestas tropicais.....	14
2.6.1 Fatores que influenciam a distribuição dos fungos.....	16
2.7 Fungos associados a <i>C. nemorosa</i> e <i>V. guianensis</i>	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Áreas de estudo.....	23
3.1.1 Serra da Ibiapaba.....	25
3.1.2 Brejo Paraibano.....	27
3.1.3 Serra da Jibóia.....	28
3.2 Expedições de coleta e procedimento de amostragem.....	30
3.3 Avaliação das condições de acondicionamento das folhas sobre a comunidade de fungo.....	30
3.4 Processamento das folhas e isolamento dos fungos.....	31
3.5 Meios de cultura e incubação.....	34
3.6 Caracterização e preservação dos fungos.....	34

3.7 Coleta dos dados ambientais.....	35
3.8 Análise dos dados.....	35
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPÍTULO I: Effects of storage conditions and culture media on the saprobic fungi diversity in tropical leaf litter	48
Abstract.....	49
Introduction.....	50
Materials and Methods.....	51
Results.....	53
Discussion.....	55
References.....	58
Tables and Figures.....	62
CAPÍTULO II: Saprobic fungi on leaf litter of two trees in the Atlantic Forest, Brazil.....	69
Abstract.....	70
Introduction.....	71
Materials and Methods.....	72
Results.....	75
Discussion.....	76
References.....	79
Tables and Figures.....	84
CAPÍTULO III: Communities of saprobic fungi on leaf litter of <i>Vismia guianensis</i> (Aubl) Choisy in remnants of the Brazilian Atlantic Forest	90
Abstract.....	91
Introduction.....	92
Material and Methods.....	93

Results.....	96
Discussion.....	97
References.....	100
Tables and Figures.....	106
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	113
6 RESUMO.....	115
7 ABSTRACT.....	117
8 ANEXOS.....	119
Anexo I - Fungos sapróbios associados ao folheto de <i>Clusia nemorosa</i> (C) e <i>Vismia guianensis</i> (V) presentes nos remanescentes de Mata Atlântica na região semiárida: Serra da Jibóia, Brejo Paraibano e Serra da Ibiapaba.....	119
Anexo II – Dados de precipitação para as áreas de coleta nos remanescentes da Serra da Jibóia, Serra da Ibiapaba e Brejo Paraibano.....	124

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1.** Mapa da cobertura original da Mata Atlântica (cinza) e dos remanescentes (preto). Fonte: Ribeiro et al. (2009).....5
- FIGURA 2.** Mapa das subregiões biogeográficas da Mata Atlântica. Fonte: Ribeiro et al. (2009).....6
- FIGURA 3.** Limites da região semiárida e os remanescentes de Mata Atlântica. 1. Serra da Ibiapaba-CE; 2. Sobral-CE; 3. Itapagé-CE; 4. Serra da Baturité-CE; 5. Crato-CE; 6. Brejo Paraibano-PB; 7. Camalaú-PB; 8. Brejo Madre de Deus-PE; 9. Serra da Jibóia-BA. Fonte: Velloso et al. (2002).....8
- FIGURA 4.** (A) *Clusia nemorosa* G. Mey. e (B) *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Fotos: Eloína Neri.....11

MATERIAL E MÉTODOS

- FIGURA 5.** Localização geográfica dos remanescentes de Mata Atlântica investigados no estudo: Serra da Ibiapaba (CE), Brejo Paraibano (PB) e Serra da Jibóia (BA).....23
- FIGURA 6.** Locais de coleta: (A, B) Visão geral do Parque Nacional de Ubajara (Serra da Ibiapaba) e interior da mata. (C, D) Visão geral da Reserva Ecológica Mata do Pau Ferro (Brejo Paraibano) e interior da mata. (E, F) Visão geral do Monte da Pioneira (Serra da Jibóia) e interior da mata. Fotos: Davi Almeida.....24
- FIGURA 7.** Localização da Serra da Ibiapaba no estado do Ceará e delimitação da área de coleta.....25
- FIGURA 8.** Localização do Brejo Paraibano no estado da Paraíba e delimitação da área de coleta.....27

FIGURA 9. (A) Localização do município de Santa Terezinha no estado da Bahia. (B) Municípios que constituem a Serra da Jibóia, destacando o Morro da Pioneira.....29

FIGURA 10. (A) Folha de *Clusia nemorosa*. (B) Folha de *Vismia guianensis*. (C) Subdivisão das áreas na folha de *C. nemorosa*.....32

FIGURA 11. Etapas do processamento das folhas para o isolamento dos fungos sapróbios segundo a metodologia de Bills & Polishook (1994) com adaptações.....33

CAPÍTULO I

FIGURE 1. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of saprobic fungi community on leaf litter of *Clusia nemorosa* at different temperatures and time of storage. Stress: 0.09.....68

CAPÍTULO II

FIGURE 1. Location of the Serra da Jibóia in the state of Bahia, Brazil, and collection site84

FIGURE 2. Rarefaction curves of fungi isolated from leaves of *Clusia nemorosa* (C) and *Vismia guianensis* (V) during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia, Brazil.....86

FIGURE 3. Ordering in two dimensions by NMDS communities of fungi associated with leaf litter of *Clusia nemorosa* (C) and *Vismia guianensis* (V) during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia, Brazil. Stress = 0.06.....88

CAPÍTULO III

FIGURE 1. Geographical location of Atlantic Forest remnants investigated in the study: Serra da Ibiapaba (Ceará), Brejo Paraibano (Paraíba) and Serra da Jibóia (Bahia).....106

FIGURE 2. Rarefaction curves of fungi isolates from leaves of *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and

Serra da Jibóia (SJ). n is the number of isolates and $ES(n)$ is the o number of species.....108

FIGURE 3. Number of fungi species associated with leaf litter of *Vismia guianensis* unique and common to the areas of study: Serra da Jibóia (SJ), Serra da Ibiapaba (SI) and Brejo Paraibano (BP).....109

FIGURE 4. Ordering in two dimensions by NMDS communities of fungi associated with leaf litter of *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ). Stress = 0.19.....111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- TABLE 1.** Numbers of isolated and richness of saprobic fungi on litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature, and culture media.....62
- TABLE 2.** Analysis of covariance (ANCOVA) of numbers of isolate and richness of saprobic fungi on litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature, and culture media63
- TABLE 3.** Diversity index Shannon and Simpson for saprobic fungi on litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature64
- TABLE 4.** Taxa and number of saprobic fungi on leaf litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature.....65

CAPÍTULO II

- TABLE 1.** Richness, number of fungi, Simpson's diversity and Chao1 of the fungal communities from leaves of *Clusia nemorosa* and *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia.....85
- TABLE 2.** Number of fungi associated with leaf litter of *Clusia nemorosa* and *Vismia guianensis* collected during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia, Brazil.....87
- TABLE 3.** Analysis of similarity percentage (SIMPER) of fungal communities isolated from *Clusia nemorosa* (C) and *Vismia guianensis* (V) during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia, Brazil.....89

CAPÍTULO III

- TABLE 1.** Number of isolates, richness, Chao1 and Simpson's diversity of the fungal communities from leaves of *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia (SJ), Serra da Ibiapaba (SI) and Brejo Paraibano (BP), Brazil.....107

TABLE 2. Number of fungi associated with leaf litter of *Vismia guianensis* collected during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ).....110

TABLE 3. Analysis of similarity percentage (SIMPER) of fungal communities isolated of leaf litter from *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ).....112

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é uma floresta tropical que abriga uma das maiores biodiversidades do planeta e constitui uma das 34 áreas prioritárias para a conservação mundial, em virtude da grande diversidade biológica e níveis de ameaça (Myers et al. 2000). Atualmente resta cerca de 11% da floresta com a maioria dos remanescentes fragmentados em pequenas áreas e separados geograficamente, levando a redução da biodiversidade (Ribeiro et al. 2009). Vários estudos foram realizados sobre a diversidade de espécies de plantas (Amorim et al. 2005; Nascimento et al. 2012; Tabarelli & Mantovani 1999) e animais (Cetra et al. 2012; Reis et al. 2013) que compõem a Mata Atlântica com o propósito de criar estratégias para a conservação e proteção da floresta. Entretanto, estudos sobre os micro-organismos presentes neste ambiente são escassos e há poucas informações (Carvalho 2012; Fraga et al. 2012; Gießelmann 2011).

Dentre os micro-organismos que constituem o ecossistema florestal, os fungos são componentes importantes, pois garantem a ciclagem de carbono e nutrientes durante a decomposição da serapilheira, disponibilizando-os aos vegetais e promovendo a manutenção da fertilidade dos solos (Hättenschwiler et al. 2011), que são naturalmente pobres em função da lixiviação (Silva & Filho 1982). Além de atuarem em processos ecológicos globais, os fungos sapróbios são importantes elementos da diversidade visto que novas espécies são constantemente descritas (Cruz & Gusmão 2009; Monteiro & Gusmão 2013; Xia et al. 2013), e são fontes potenciais de novos compostos bioativos (Morath et al. 2012). Apesar da sua grande importância ecológica e econômica, os fungos são organismos pouco estudados principalmente em regiões tropicais. As estimativas da diversidade alcançam valores de 1.5 a 3.3 milhões de fungos, sendo que apenas 100.000 espécies são conhecidas (Hawksworth 2012).

As comunidades de fungos associados aos substratos vegetais da serapilheira sofrem variações espaciais e temporais e são afetadas por numerosos fatores bióticos e abióticos, como as características da espécie da planta, variações sazonais e heterogeneidade espacial (Allegrucci et al. 2014; Hyde et al. 2007; Lodge 1997; Lodge & Cantrell 1995). Alguns aspectos metodológicos empregados para a coleta de dados também têm influências significativas sobre a diversidade da comunidade, no entanto os seus efeitos foram pouco avaliados. Entre estes aspectos incluem o esforço amostral (Magurran 1988), processo de acondicionamento do material vegetal (Paullus et al. 2003a), técnicas

de detecção e isolamento dos fungos (Collado et al. 2007; Unterseher et al. 2009) e métodos de caracterização e identificação dos isolados (Bills & Polishook 1994).

O conhecimento dos fatores que influenciam a distribuição espacial e temporal dos fungos sapróbios é fundamental para entender o papel regulatório que desempenham nos ecossistemas, além de ajudar a fornecer subsídios para políticas de conservação e manutenção de áreas com elevado nível de ameaça. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a diversidade e distribuição de fungos associados ao folheto em três remanescentes de Mata Atlântica, na região semiárida do Brasil: Brejo Paraibano-PB, Serra da Ibiapaba-CE e Serra da Jibóia-BA; bem como avaliar os efeitos de aspectos metodológicos (como o tempo e temperatura de acondicionamento das folhas) e o uso de diferentes meios de cultura, sobre a microbiota. Amostras de folheto de *Clusia nemorosa* G. Mey e *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy foram coletadas em duas estações climáticas, chuvosa e seca, e processadas utilizando a técnica de filtração de partículas para o isolamento dos fungos.

Os resultados obtidos foram distribuídos em três capítulos:

I. Effects of storage conditions and culture media on the saprobic fungi diversity in tropical leaf litter.

Neste capítulo foram avaliados os efeitos do tempo (material fresco e 07, 15, 21 e 28 dias) e temperatura (ambiente e 4°C) no acondicionamento das folhas de *C. nemorosa*, além do uso de dois meios de cultura (DRBC e MYE) sobre a diversidade de fungos. São apresentados a riqueza de espécies e o número de isolados obtidos para cada variável analisada; testes comparativos entre as comunidades isoladas e índices de diversidade; e o padrão de distribuição das comunidades investigadas.

II. Saprobic fungi on decaying leaf litter of two trees in the Atlantic Forest, Brazil.

O capítulo apresenta uma comparação entre as comunidades de fungos de *C. nemorosa* e *V. guianensis* durante as estações chuvosa e seca. São apresentadas as comparações da riqueza, através das curvas de rarefação e estimador de riqueza, e diversidade, por meio do índice de diversidade, entre as comunidades; similaridades na composição de espécies através da análise de agrupamento, teste de significância para avaliar as diferenças entre as

comunidades, análise para determinar as espécies que mais contribuíram para as dissimilaridades, e o padrão de distribuição dos fungos nos diferentes tipos de folhedo.

III. Communities of saprobic fungi on leaf litter of *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy in remnants of the Brazilian Atlantic Forest.

O terceiro capítulo da tese investiga a distribuição espacial e temporal da comunidade de fungos associada ao folhedo de *V. guianensis* presente nos três remanescentes de Mata Atlântica. São apresentados os resultados das curvas de rarefação, índice de diversidade e estimador de riqueza para comparações da riqueza e diversidade entre as comunidades; similaridades na composição de espécies entre as áreas pela análise de agrupamento; teste de significância para avaliar as diferenças na comunidade entre as áreas e estações e padrão de distribuição das comunidades, além da análise para determinar as espécies de fungos que mais contribuíram para a dissimilaridade entre as comunidades.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Mata Atlântica

As florestas tropicais representam um dos ambientes mais ricos em diversidade do planeta, abrigando mais de 50% da diversidade existente (Myers et al. 2000). Entretanto, ao longo do tempo vêm sofrendo grandes mudanças devido à intensa degradação e destruição pelas atividades antrópicas (Tabarelli et al. 2010).

A Mata Atlântica é uma floresta tropical situada na América do Sul e se distribui ao longo de três países: Brasil, Argentina e Paraguai (Tabarelli et al. 2010). No Brasil, é constituída por um conjunto de formações florestais (ombrófila densa, ombrófila mista, estacional semidecidual, estacional decidual e ombrófila aberta) e ecossistemas associados como as restingas, manguezais e campos de altitude que se estendem originalmente em uma área de 1.300.000 km² em 17 estados, desde o Piauí até o Rio Grande do Sul (SOS Mata Atlântica 2014).

Desde o período da colonização a Mata Atlântica tem sofrido elevados níveis de perda de habitat e outros distúrbios, causados pelas atividades antrópicas, eliminando grande parte dos seus ecossistemas naturais (SOS Mata Atlântica 2014). Atualmente, a área remanescente de todo o bioma corresponde apenas a 11.7% da sua vegetação original e apresenta-se fragmentada com áreas bastante reduzidas e separadas geograficamente (Figura 1, Ribeiro et al. 2009). Este valor atualizado é superior aos 8% previamente considerado pelo Ministério do Meio Ambiente (2000), em consequência da inclusão das florestas secundárias intermediárias e dos pequenos fragmentos de floresta, menores que 100 ha, no mapeamento da cobertura remanescente. Considerando as áreas remanescentes na Argentina e Paraguai esse valor se eleva para 12.9% (Chebez & Hilgert 2003; Huang et al. 2009).

Embora exista uma grande perda da cobertura original e elevada fragmentação da Mata Atlântica, os índices de biodiversidade ainda são elevados incluindo mais do que 20.000 espécies de plantas, 263 espécies de mamíferos, 936 espécies de pássaros, 306 espécies de répteis, 475 espécies de anfíbios, além de outras espécies que ainda não foram descritas (Mittermeier et al. 2005). As características geográficas como a ampla faixa latitudinal e longitudinal, que abrange toda a área de cobertura da Mata Atlântica, e a distribuição de chuva que é bastante heterogênea, com diminuição da pluviosidade nas áreas costeiras (4.000 mm/ano) em direção ao continente (1.000 mm/ano), associada a

grande faixa de altitude, são os principais aspectos que favorecem a biodiversidade existente (Ribeiro et al. 2009).

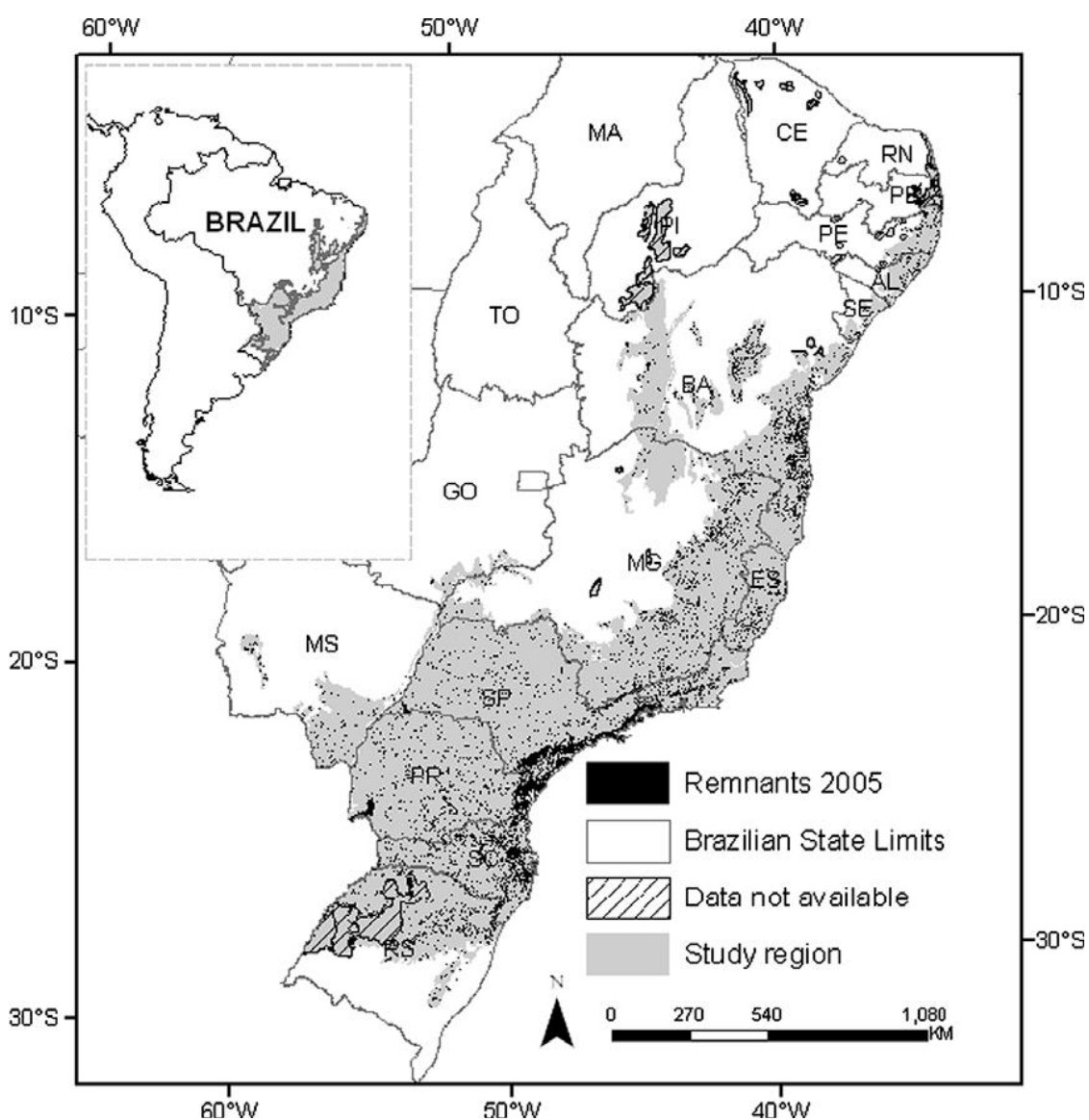


Figura 1. Mapa da cobertura original da Mata Atlântica (cinza) e dos remanescentes (preto). Fonte: Ribeiro et al. (2009).

A Mata Atlântica também apresenta elevados níveis de endemismo, alcançando valores de 40% das plantas vasculares e 16-60% de toda a fauna incluindo os pássaros, mamíferos, répteis e anfíbios (Mittermeier et al. 2005). Entretanto, as espécies endêmicas não são homoganeamente distribuídas em toda a extensão da floresta encontrando-se agrupadas em distintas áreas sendo denominadas de unidades ou subregiões biogeográficas

da Mata Atlântica. Silva & Casteleti (2003) reconheceram 08 subregiões das quais 05 foram definidas como centros de endemismo (Brejos Nordestinos, Pernambuco, Bahia, Diamantina e Serra do Mar) e 03 como áreas de transição (Araucária, Interior e São Francisco) (Figura 2).

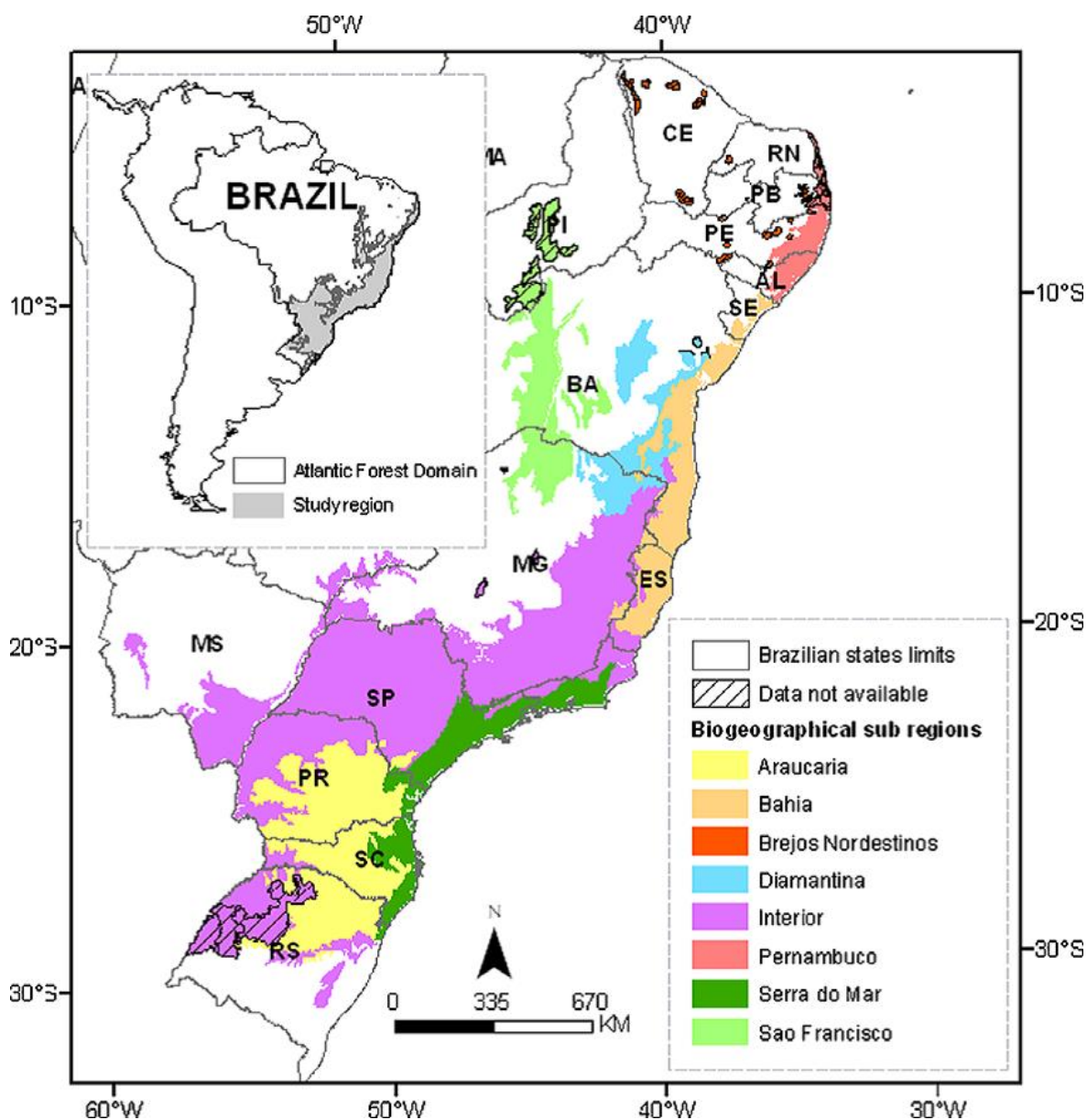


Figura 2. Mapa das subregiões biogeográficas da Mata Atlântica. Fonte: Ribeiro et al. (2009).

Uma das hipóteses para a formação dos centros de endemismo leva em consideração uma dinâmica história evolutiva da Mata Atlântica e propõe uma conexão no passado com a Floresta Amazônica cuja biota era amplamente distribuída na região (Silva

et al. 2004). Períodos posteriores de isolamento levaram a especiação alopátrica originando os padrões atuais de distribuição e diferenciação das espécies em ambas as florestas e nas diferentes áreas da Mata Atlântica, as quais constituem os centros de endemismo (Silva et al. 2004; Silva & Casteleti 2003).

A Mata Atlântica é considerada uma das 34 áreas prioritárias para a conservação mundial, em virtude da grande diversidade biológica (8.000 espécies vegetais endêmicas) e níveis de ameaça (cerca de 88% da sua extensão perdida) sendo conhecida como hotspot (Myers et al. 2000; Mittermeier et al. 2005). Uma área é designada como hotspot quando apresenta no mínimo 1.500 espécies de plantas vasculares endêmicas (correspondendo a 0.5% do total de plantas vasculares do mundo) e perda de 70% ou mais da sua vegetação original (Myers et al. 2000). Diante das perdas significativas e com o intuito de preservar os remanescentes de Mata Atlântica, o Ministério do Meio Ambiente (2000) determinou cerca de 160 áreas prioritárias para a conservação deste bioma caracterizando estas áreas desde “provável importância biológica” até “extrema importância biológica” de acordo aos critérios da flora e fauna.

A área de proteção florestal dentro da extensão da Mata Atlântica é de aproximadamente 22.600 km² correspondendo a 1.62% da região. Considerando a floresta remanescente, as reservas naturais representam 14.4%, entretanto, elas protegem apenas 9.3% visto que outros tipos de vegetação ou coberturas de terra também ocorrem dentro dessas reservas. As unidades biogeográficas que apresentam maiores percentuais de áreas protegidas são a Serra do Mar (25.2%), seguido pelo Interior (6.8%) e Bahia (4.2%). Todas as outras regiões têm menos do que 4% de floresta remanescente sob proteção (Ribeiro et al. 2009).

2.2 A região semiárida brasileira e os remanescentes de Mata Atlântica

A região semiárida corresponde basicamente à delimitação do Bioma Caatinga, e está praticamente incluída na região Nordeste compreendendo 1.133 municípios distribuídos nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais na região Sudeste (Ministério da Integração Nacional 2005) (Figura 3). Ocupa uma área de aproximadamente 970.000 km² e em grande parte de sua extensão o clima é quente e semiárido, fortemente sazonal. As médias anuais de temperatura (28°C) e evaporação (2.000 mm) são elevadas com menos

de 1.000 mm de chuva por ano, distribuídos quase todos em um período de três a seis meses (Giulietti & Queiroz 2006). A má distribuição das chuvas associada à alta evapotranspiração são os fatores responsáveis pelo fenômeno da seca que periodicamente assola a região (Ministério da Integração Nacional 2005).

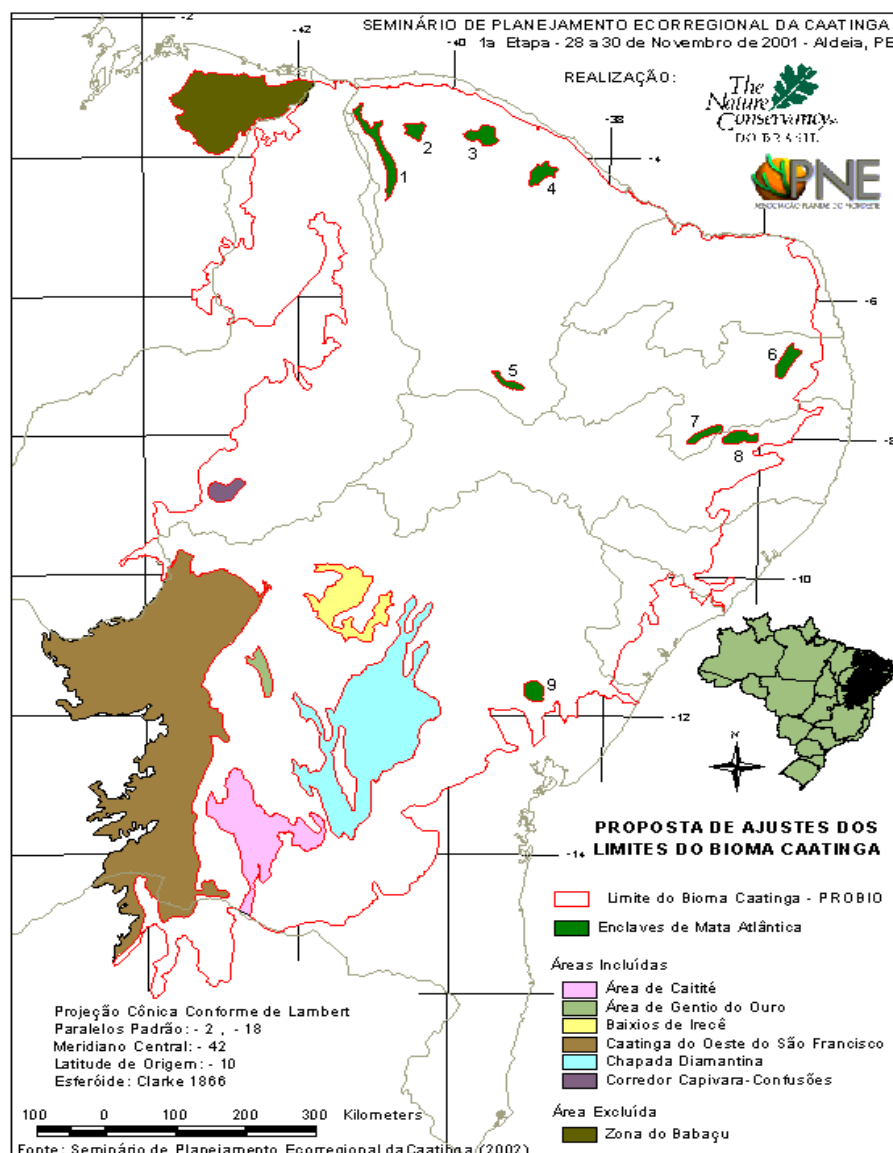


Figura 3. Limites da região semiárida e os remanescentes de Mata Atlântica. 1. Serra da Ibiapaba-CE; 2. Sobral-CE; 3. Itapagé-CE; 4. Serra da Baturité-CE; 5. Crato-CE; 6. Brejo Paraibano-PB; 7. Camalaú-PB; 8. Brejo Madre de Deus-PE; 9. Serra da Jibóia-BA. Fonte: Velloso et al. (2002).

Apesar das condições severas, o semiárido apresenta uma surpreendente diversidade de ambientes, proporcionados por uma variedade de tipos de vegetação variando com o mosaico de solos e a disponibilidade de água. A vegetação mais típica é a caatinga e se situa nas depressões sertanejas (Cavalcante 2005; Giuliatti & Queiroz 2006). Os diferentes padrões de caatingas estendem-se também por regiões mais altas e de relevo variado, e incluem a caatinga arbustiva a arbórea, a mata seca, o carrasco e as formações abertas com domínio de cactáceas e bromeliáceas, entre outros (Giuliatti & Queiroz 2006).

Nas serras do semiárido em altitudes mais elevadas, entre 600-1.000 m, podem ser observadas as matas úmidas, Florestas Perenifólias de Altitude, que constituem os remanescentes da Mata Atlântica estabelecidos na região e cercados pela caatinga, sendo conhecidos localmente como brejos de altitude (Giuliatti & Queiroz 2006; Tabarelli & Santos 2004). A localização geográfica, altitude, disposição do relevo em relação aos ventos do litoral e características do solo, que abriga toda a matéria orgânica produzida nesses remanescentes, são fatores que possivelmente mantêm o recobrimento florestal nessas elevações e também responsáveis pelo alto grau de endemismo (Cavalcante 2005).

Segundo Vasconcelos Sobrinho (1971), existem 43 brejos distribuídos nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Velloso et al. (2002) consideram apenas nove fragmentos de tamanhos variados de Mata Atlântica no semiárido localizados nas regiões norte e sul do Ceará, leste da Paraíba, Pernambuco e Bahia (Figura 3), enquanto que Cavalcante (2005) relata o montante de 20 fragmentos no semiárido. De acordo a Tabarelli & Santos (2004) cerca de 85% dos brejos de altitude têm sido destruídos e apenas 0.16% (30.05 km²) da área remanescente (2.626 km²) pertencem a unidades de conservação.

A hipótese proposta para a formação desses brejos de altitude remonta desde o Cretácio Superior (entre 100-65 milhões de anos atrás) quando existia o supercontinente chamado de Gondwana (Cavalcante 2005). Nas terras que formariam a América do Sul havia uma formação florestal contínua no litoral leste chamada de floresta Gondwânica, precursora da floresta Amazônica, Mata Atlântica e dos brejos de altitude (Cavalcante 2005; Cavalcanti & Tabarelli 2004). Em consequência das intensas variações climáticas no Pleistoceno (1.8 milhão até 11 mil anos atrás), como as glaciações e a redução de água circulante na atmosfera, ocorreram expansões do deserto e a vegetação adaptada à seca se disseminou, circundou e isolou as florestas, para finalmente configurar os fragmentos de florestas úmidas do semiárido brasileiro.

Silva & Casteleti (2003) denominaram de Brejos Nordestinos os brejos de altitude situados ao norte do Rio São Francisco e esta região torna-se mais distinta em relação aos remanescentes situados ao sul do Rio São Francisco uma vez que há grande influência da Floresta Amazônica (Andrade-Lima et al., 1982; Santos et al., 2007; Cavalcanti & Tabarelli, 2004).

2.3 *Clusia nemorosa* e *Vismia guianensis*: distribuição e caracterização

O gênero *Clusia*, pertencente à família Clusiaceae, é composto por aproximadamente 300 espécies (Stevens 2012) que se distribuem em toda a região Neotropical, do sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil, e ocorrem nos mais diversos habitats como planícies, florestas montanhosas, cerrados e dunas (Bittrich 2009). No Brasil há em torno de 67 espécies com distribuição mais frequente na região Amazônica (Andrade et al. 2002; Bittrich 2009).

Dentre as espécies que ocorrem no Brasil, *Clusia nemorosa* tem ampla distribuição ocorrendo nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. É popularmente conhecida como mucugê-bravo, ceboleira e orelha-de-burro, na região Nordeste, e como apuí, mangue-branco e manga brava, na região Amazônica (Bittrich 2009). Apresenta o hábito arbustivo ou arbóreo, alcançando até 15 metros de altura com folhas oblongas e cartáceas, opostas e discolores, superfície adaxial mais escura do que abaxial, muitas vezes levemente a fortemente brilhante (Cabral 2011; Figura 4A). É utilizada como planta ornamental, devido à beleza e exuberância das suas flores, além das folhas e casca terem propriedades medicinais como anti-inflamatório e analgésico (Farias et al. 2012), e na resina floral, bem como nas folhas, raiz e frutos, há compostos com atividades biológicas anti-HIV e antimicrobiana (Oliveira et al. 1996).

Vismia guianensis, pertencente à família Hypericaceae, é nativa da América do Sul e ocorre na Colômbia, Venezuela, Guiana e Brasil, mais precisamente nas regiões Norte e Nordeste (Bittrich 2010). É conhecida popularmente como lacre, árvore da febre, goma-lacre, pau-de-lacre ou lacre-branco. Apresenta hábito arbóreo de pequeno porte, 3 a 7 m de altura, copa aberta e irregular, com ramos novos ferrugíneos-pubérulos, cujas folhas são verdes na região superior e amareladas na região inferior (Lorenzi & Matos 2002; Figura 4B).



Figura 4. (A) *Clusia nemorosa* G. Mey. e (B) *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.
Fotos: Eloína Neri

A madeira de *V. guianensis* é de boa qualidade e própria para construção civil, marcenaria de luxo e carpintaria (Camelo 2010). Há relatos do seu uso na medicina popular, principalmente, no tratamento de dermatoses, apresentando-se como um potente laxativo, além de suas folhas possuírem propriedades antipiréticas e antireumáticas e serem empregadas como tônico (Lorenzi & Matos 2002). O seu látex de cor amarelo-alaranjado tem sido utilizado para o tratamento de feridas, herpes e infecções por fungos na pele, por algumas tribos do Amazonas (Pasqua et al. 1995), e para a obtenção de esmaltes de unhas (Lorenzi & Matos 2002).

No sistema de classificação de Cronquist (1981) a espécie *V. guianensis* pertence à família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae, e à ordem Theales por apresentar características como presença de látex e frutos formando cápsulas. Este sistema considera as características morfológicas das espécies e é amplamente utilizado entre os botânicos. Em classificações mais recentes, baseada na filogenia molecular, a família Hypericaceae é reconhecida como distinta de Clusiaceae. Ambas as famílias pertencem à ordem Malpighiales pelo sistema de classificação APGIII (Angiosperm Phylogeny Group 2009)

e na filogenia são grupos irmãos formando o clado designado de clusióide (Ruhfel et al. 2011).

2.4 Os fungos: classificação, caracterização e diversidade

A classificação mais atual do Reino Fungi foi proposta por Hibbett et al. (2007), baseada em dados moleculares e em estudos taxonômicos anteriores, que considera os filos Microsporidia, anteriormente definido como protista, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota - estes dois últimos formando o subreino Dikarya; e os subfilos segregados de Zygomycota. Gryganskyi et al. (2012) erigiu o subfilo Entomophthoromycotina a filo Entomophthoromycota, baseado na monofilia do grupo, ampliando a classificação proposta por Hibbet et al. (2007). O grupo dos fungos conidiais, também conhecidos como assexuais, é caracterizado pela reprodução assexuada e relacionado ao subreino Dikarya, no entanto não tem valor taxonômico.

Os fungos estão presentes nos mais variados ambientes, principalmente os terrestres e os aquáticos de águas continentais. A grande maioria são sapróbios e a decomposição é a principal função ecológica. Podem ainda viver associados a outros organismos como parasitas, de vegetais, animais, algas e outros fungos; como mutualistas, formando associações com raízes de plantas (micorrizas), rúmen e ceco de mamíferos herbívoros ruminantes (fungos anaeróbios) e ninhos de formigas; e como predadores, algumas espécies que habitam o solo tem a capacidade de imobilizar protozoários e nemátodos através de estruturas somáticas desenvolvidas no micélio. Existem ainda as associações intermediárias, caracterizadas como uma relação que não alcança o parasitismo nem o mutualismo estrito, como no caso de líquens e fungos endófitos (Alexopoulos et al. 1996).

Segundo Hawksworth (1991), os fungos estão entre os organismos mais diversos do planeta, perdendo apenas para os insetos. É um grupo pouco conhecido, com cerca de 100.000 espécies descritas (Kirk et al. 2008), no entanto as estimativas para o número total de espécies alcançam valores em milhões. Hawksworth (1991; 2001) propôs uma estimativa de 1.5 milhão, com base na proporção fungo/planta vascular em regiões temperadas. Esta estimativa é considerada conservadora, uma vez que os fungos associados aos insetos e, principalmente, a diversidade de plantas e habitats em regiões tropicais não foram avaliados. Hawksworth (2012) discute as estimativas propostas ao

longo de 11 anos após a sua publicação de 2001 e considera a estimativa mínima de 1.5 podendo alcançar até 3 milhões de fungos.

2.5 Fungos associados à serapilheira

Os fungos sapróbios são componentes importantes dos ecossistemas florestais, uma vez que garantem a ciclagem de carbono e nutrientes disponibilizando-os aos vegetais e promovendo a manutenção da fertilidade dos solos (Hättenschwiler et al. 2011).

A matéria orgânica acumulada na superfície do solo, conhecida como serapilheira, é constituída por restos vegetais, animais e excrementos. O componente vegetal (folhas, madeira, raízes, galhos, frutos, flores) representa a maior fração da serapilheira, sendo 90% da sua produção primária na floresta acumulada no solo (Graça et al. 2005). Dentre o componente vegetal, as folhas constituem a parte mais significativa e a sua decomposição é um processo vital para o ecossistema, não apenas por representar a maior biomassa na serapilheira (cerca de 70%), mas também pelo seu vasto conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos (Graça et al. 2005).

A decomposição da serapilheira resulta na desintegração gradual da matéria orgânica, liberação de seus nutrientes e moléculas de água e dissipação de parte do dióxido de carbono, sendo um processo que mantém a fertilidade e produtividade do ecossistema (Mason 1980). A taxa do processo de decomposição depende do ambiente físico (temperatura, umidade, sazonalidade e fatores pedológicos), composição do substrato (teores de lignina, celulose, compostos fenólicos, elementos minerais, substâncias estimulantes ou alelopáticas no material biológico) e comunidade de organismos decompositores (micro-organismos e fauna) (Meguro et al. 1980; Zhang et al. 2008). Os fungos representam os principais agentes decompositores do material vegetal, por possuírem um arsenal enzimático com capacidade de degradação de compostos orgânicos complexos como a celulose, hemicelulose, ácidos aromáticos, polifenóis e algumas proteínas (Mason 1980).

A maioria das espécies de fungos decompositores do substrato vegetal são microfungos caracterizados por apresentar estruturas reprodutivas diminutas, podendo medir até 2mm, a microscópicas e são representados pelos fungos tradicionalmente conhecidos como Zygomycota, os fungos conidiais, alguns ascomicetos e basidiomicetos (Hawksworth et al. 1995; Cannon & Sutton 2004).

Os fungos conidiais são os mais representativos e se reproduzem através de propágulos assexuais produzidos por mitose ou a partir de estruturas originadas do micélio somático (Alexopoulos et al. 1996). As estruturas especializadas para a reprodução assexual são caracterizadas como conidióforos, células conidiogênicas e conídios (esporos produzidos por mitose), os quais apresentam grande diversidade morfológica e têm importância significativa na identificação das espécies (Gusmão et al. 2006). Quando a identificação é baseada na análise de sequências de DNA, a maioria dos fungos parece pertencer ao filo Ascomycota (Guo et al. 2000; Shenoy et al. 2007).

As alterações físicas e químicas ocorridas no substrato durante o processo de decomposição induzem a ocupação sequencial de espécies ou associações de fungos (Kubartová et al. 2009). Essas mudanças na estrutura da comunidade, ao longo do tempo, sobre um determinado substrato é denominado de “sucessão” e tem sido o foco de vários estudos (Kodsueb et al. 2008a; Prewitt et al. 2014; Voříšková & Baldrian 2013). O folhedo fornece um habitat único para abrigar uma grande diversidade de espécies uma vez que o componente foliar apresenta diferentes morfologias e constituições químicas. Isso talvez justifique o fato da maioria dos trabalhos taxonômicos abordarem os decompositores de detritos foliares (Castañeda-Ruiz et al. 2003; Cruz & Gusmão 2009; Gusmão et al. 2008; Monteiro & Gusmão 2013; Rambelli et al. 2004).

2.6 Diversidade de fungos sapróbios em florestas tropicais

O termo diversidade tem sido amplamente utilizado, nas múltiplas áreas do conhecimento (biologia, ecologia, antropologia e linguística), e engloba vários conceitos (Sarkar 2010). O termo biodiversidade tem sido adotado como uma contração da “diversidade biótica” e “diversidade biológica” (Hawksworth 1991). Segundo Melo (2008), ambos os termos são usados para expressar uma série de significados que se tornaram genéricos e superficiais, havendo uma necessidade de fornecer informações adicionais. A diversidade biológica, em um sentido mais amplo, descreve a variabilidade em todas as formas de vida e nos diferentes níveis, incluindo a diversidade de genes, espécies e ecossistemas (Sarkar 2010). No presente trabalho o termo diversidade foi aplicado no sentido mais restrito de “diversidade de espécies” para englobar os aspectos de riqueza e equabilidade.

A riqueza expressa o número de espécies presentes numa determinada comunidade ou área e a equabilidade indica o quanto que as espécies são igualmente abundantes na comunidade (Magurran 1988). Riqueza e equabilidade representam os atributos da comunidade (Melo 2008) e, desta forma, são parâmetros para medir a diversidade, bem como a combinação destes dois fatores (Magurran 1988). As medidas de diversidade podem ser divididas em três principais categorias: índices de riqueza de espécies, modelos de abundância de espécies e índices de diversidade (Magurran 1988). A riqueza de espécies é a forma mais direta de se medir a diversidade e tem sido comumente utilizada em vários estudos (Magalhães et al. 2011; Monkai et al. 2013; Paulus et al. 2006).

A diversidade de fungos em regiões tropicais tem sido investigada mais intensamente durante as últimas décadas devido ao fato destes organismos apresentarem grande potencial para aplicações industriais e biotecnológicas (Morath et al. 2012), serem importantes elementos da diversidade uma vez que espécies são constantemente descritas (Cruz & Gusmão 2009; Gusmão et al. 2008; Xia et al. 2013) e para melhor compreensão do seu papel funcional nos ecossistemas (Hättenschwiler et al. 2011; Sayer 2006). Para alguns fungos, como os endófitos, um gradiente latitudinal de diversidade tem sido relatado, com as regiões tropicais apresentando comunidades mais ricas em espécies (Arnold & Lutzoni 2007). Embora esta tendência não tenha sido sistematicamente verificada para fungos associados aos substratos vegetais em decomposição, vários estudos têm demonstrado que este grupo é potencialmente diverso em áreas tropicais (Hawksworth 2012; Piepenbring et al. 2012). Segundo Lodge (1997), a diversidade de plantas e habitats, além da abundância de substratos, presentes nas regiões tropicais são fatores significativos que contribuem para a maior diversidade de fungos.

Em uma floresta tropical em Porto Rico, Polishook et al. (1996) observaram uma elevada riqueza de espécies, entre 101 a 173 táxons, associada a cinco gramas de folheto de *Guarea guidonea* e *Manilkara bidentata*. Na África, Rambelli et al. (2004) detectaram 184 espécies de fungos em folhas de 71 plantas. Paulus et al. (2006) obtiveram 419 táxons isolados do folheto de seis plantas pertencentes à quatro famílias botânicas, na Austrália. Kodsueb et al. (2008b) isolaram 239 táxons de 150 amostras de substratos lignícolas de *Magnolia liliifera*, *Manglietia garrettii* e *Michelia baillonii*, na Tailândia. Em outro estudo, também na Tailândia, Monkai et al. (2013) detectaram 51 espécies de fungos de 20 folhas da serapilheira de *Magnolia liliifera* e *Cinnamomum iners*, e consideraram os fungos sapróbios do país como um grupo hiperdiverso. Considerando plantas individuais, Paulus

et al. (2003a) detectaram 112 táxons em cinco gramas de folhas de *Neolitsea dealbata*, na Austrália; Seephueak et al. (2011) isolaram 497 táxons de ramos de *Hevea brasiliensis* em diferentes estágios de decomposição, na Tailândia; e Shanthi & Vital (2012) detectaram 142 táxons em folhas de *Anacardium occidentale*, na Índia.

Em todos os trabalhos relatados há uma elevada diversidade de fungos e aumentando o número de amostras ou de coletas, conseqüentemente, maior número de espécies poderia ser observado (Paulus et al. 2006). Outros fatores também têm influências significativas na distribuição dos fungos e conhecer os efeitos que determinam sobre a comunidade é fundamental para entender o papel regulatório que desempenham nos ecossistemas.

2.6.1 Fatores que influenciam a distribuição dos fungos

Espécie da planta

Os fungos sapróbios têm sido tradicionalmente considerados generalistas, não apresentando qualquer nível de especificidade ao substrato, devido ao fato de produzirem enzimas não específicas que degradam a maioria dos componentes da célula vegetal como a celulose, hemicelulose e lignina (Hyde 2001). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que há um nível de especificidade/recorrência entre fungos sapróbios e táxons de plantas (Hyde et al. 2007), e parece estar mais relacionado as diferenças na frequência relativa do que aos dados de presença/ausência de espécies (Lodge 1997; Zhou & Hyde 2001).

Zhou & Hyde (2001) discutem os conceitos dos termos comumente aplicados para interação fungo sapróbio/planta e consideram “exclusividade” e “recorrência” como os mais apropriados. Segundo os autores, o termo exclusividade é a ocorrência de um fungo sapróbio sobre substratos de uma determinada planta ou grupo de plantas relacionadas. Enquanto que o termo recorrência define a presença frequente ou abundante de um fungo sapróbio sobre plantas particulares ou relacionadas, embora possa ocorrer, em menor frequência, sobre diferentes plantas no mesmo ambiente. Ambos os termos definidos por Zhou & Hyde (2001) foram considerados no presente trabalho.

Polishook et al. (1996) observaram uma similaridade maior entre comunidades de fungos associadas ao folheto de uma mesma espécie de planta (*Guarea guidonea* e *Manilkara bidentata*) presente em diferentes áreas de estudo, quando comparada as comunidades de diferentes plantas na mesma área. Resultado semelhante foi encontrado por Paulus et al. (2006) investigando a heterogeneidade espacial de fungos sapróbios associados ao folheto de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas. Hyde et al. (2007) compilaram dados de diversos estudos demonstrando a recorrência de fungos em diferentes níveis taxonômicos de plantas, considerando espécies de um mesmo gênero, gêneros de uma mesma família e diferentes famílias de plantas.

Uma das hipóteses para a recorrência de fungos sobre substratos de plantas em decomposição é que endófitos, presentes nos tecidos internos das folhas vivas, persistem na senescência e quando as folhas caem para formar a serapilheira, são os primeiros a atuarem na decomposição (Allegrucci et al. 2014; Hyde et al. 2007; Promputtha et al. 2010; Unterseher et al. 2013). Muitos fungos endófitos são específicos às plantas hospedeiras e quando o tecido vegetal entra em senescência poderiam alternar o seu modo de vida, tornando-se sapróbios (Zhou & Hyde 2001). Estudos recentes demonstraram a sobreposição das comunidades de endófitos e saprófitas de uma planta a partir de dados enzimáticos (Promputtha et al. 2010) e moleculares (Unterseher et al. 2013), indicando que os endófitos continuam a colonizar os substratos mesmo em decomposição.

Outros estudos têm sugerido que a recorrência está mais relacionada às características morfológicas (como o formato das folhas e das estruturas presentes na sua superfície) e anatômicas (como as diferenças nos conteúdos de lignina e celulose) do que ao conceito de especificidade de sapróbios a plantas específicas, como ocorre em interações estritamente específicas de patógeno/hospedeiro (Lodge 1997; Polishook et al. 1996).

Embora as diferenças entre as comunidades de fungos associadas ao folheto de plantas tropicais sejam notórias, os estudos são incompletos e fragmentados e poucos têm avaliado a questão sistematicamente.

Variação sazonal

A precipitação é considerada um fator ambiental essencial para a dispersão e germinação dos propágulos dos fungos e para o processo de decomposição (Cannon &

Sutton 2004). A disponibilidade de água favorece o crescimento dos fungos e desta forma, têm importantes efeitos sobre a diversidade. Em substratos em decomposição o potencial de água é maior do que em folhas vivas, considerando o mesmo conteúdo de água, em função do potencial de soluto gerado pela grande disponibilidade de moléculas hidrolisadas, por outro lado a perda de água ocorre em maior velocidade (Dix 1985). As alterações hídricas, dentre outros fatores, ao longo do tempo, proporcionam mudanças na comunidade pois os fungos variam sua tolerância ao estresse hídrico (Dix 1985).

As comunidades de fungos em períodos de elevada umidade tendem a ser mais diversas embora alguns estudos tenha observado maior riqueza em períodos mais secos. Paulus et al. (2006) encontraram comunidades de fungos associadas as diferentes plantas com maior riqueza na estação úmida. Muthukrishnan et al. (2012) observaram comunidades de fungos decompositores e tolerantes a alcalinidade mais diversas nos períodos de monção na Índia comparado ao período pós monção e no verão. Kumar et al. (2012), verificaram que além das comunidades serem mais ricas em espécies, as taxas de decomposição também foram maiores durante o período mais úmido.

Entretanto, Kodsueb et al. (2008) e Seephueak et al. (2011) observaram comunidades associadas à substratos lignícolas apresentando maior riqueza durante a estação seca. Segundo os autores, este resultado é, provavelmente, devido à elevada umidade e baixa aeração durante o período mais chuvoso. Nessas circunstâncias, a temperatura se eleva e não se distribui uniformemente por todo o substrato e, então, o crescimento de alguns fungos poderia ser restrito (Bárcenas-Moreno et al. 2009). Yanna et al. (2001) não verificaram nenhum padrão sazonal na comunidade de fungos em frondes de palmeiras presentes em Brunei, Austrália e Hong Kong.

Heterogeneidade espacial

A heterogeneidade espacial pode ser observada em diferentes escalas: nas diferentes partes do substrato (Yanna et al. 2001), nos vários estratos da serapilheira (Muthukrishnan et al. 2012) e em diferentes áreas de estudo (Magalhães et al. 2011; Paulus et al. 2006; Polishook et al. 1996).

Yanna et al. (2001) encontraram comunidades de fungos distintas entre as várias partes das frondes de palmeiras (folha, extremidade, meio e base da raque). As comunidades obtidas da raque foram mais similares entre si, embora algumas espécies

estavam presentes em todas as partes do substrato. Diferentes comunidades de fungos também foram observadas nas diversas camadas da serapilheira: camada L (camada mais superficial, consistindo de folhas senescentes, recentemente caídas); camada F1 (situada logo após a camada L); e camada F2 (abaixo da camada F1 e em contato com o solo) (Muthukrishnan et al. 2012). Os autores encontraram uma elevada sobreposição de espécies entre as três camadas embora a camada F1 tenha apresentado maior riqueza.

Em áreas de estudo distintas, separadas por 200 metros (Polishook et al. 1996) e 40-70 Km (Magalhães et al. 2011; Paulus et al. 2006) utilizando a mesma espécie vegetal, foi observado comunidades de fungos bastante similares no folheto, compartilhando um grande número de espécies. Considerando uma maior escala de heterogeneidade espacial, Yanna et al. (2001) encontraram diferenças significativas entre as comunidades de fungos associadas as frondes em decomposição de palmeiras coletadas na Austrália, Brunei e Hong Kong, com baixa sobreposição de espécies. Segundo Feinstein & Blackwood (2013) as diferenças encontradas na composição da comunidade de fungos em função da heterogeneidade espacial (em maior ou menor escala) devem-se aos fatores associados, principalmente, às condições climáticas particulares em cada ambiente.

Aspectos metodológicos

A diversidade da comunidade de fungos sapróbios é, em parte, dependente dos aspectos metodológicos empregados para a coleta de dados, incluindo o esforço amostral (Magurran 1988), processo de acondicionamento do material vegetal (Paulus et al. 2003a), técnicas de detecção e isolamento dos fungos (Collado et al. 2007; Unterseher et al. 2009) e métodos de caracterização e identificação dos isolados (Bills 1996; Bills & Polishook 1994).

A riqueza de espécies é positivamente correlacionada ao esforço amostral, ou seja, aumentando o número de amostras analisadas um número maior de espécies poderá ser observado (Magurran 1988). Em grupos hiperdiversos como os fungos, o aumento do esforço de coleta acrescenta novos táxons à comunidade e isto é devido à detecção constante de espécies infrequentes ou raras. Nesses casos, a curva do coletor dificilmente alcançará uma assíntota até mesmo em locais intensivamente estudados, como as reservas britânicas de Esher Common (Surrey, U. K.) e Slapton Ley (Devon, U. K.) que são

investigadas há mais de 40 anos e anualmente novas espécies de fungos são acrescentadas às listas de inventários (Hawksworth 2012; Hawksworth & Mueller 2005).

O acondicionamento do substrato para posterior análise da diversidade tem sido comumente realizado em muitos estudos devido a, principalmente, dois fatores: as áreas de coletas serem distantes e o volume de material a ser processado. Os efeitos deste procedimento sobre a diversidade de fungos foram avaliados por Paulus et al. (2003a) em folhas de *Neolitsea dealbata* acondicionadas por um período até 28 dias. Os autores observaram que o número de isolados diferiu significativamente, enquanto que o número de táxons não foi efetivamente afetado por até três semanas de acondicionamento.

A escolha do método de detecção e isolamento dos fungos é um passo importante para os estudos de diversidade e deve ser baseada nos propósitos do trabalho. Numerosos métodos têm sido desenvolvidos e cada um deles apresentam limitações para as estimativas da diversidade. Métodos que se baseiam na observação das estruturas reprodutivas sobre a superfície do substrato (método direto) poderiam subestimar a diversidade em função das estruturas não estarem presentes no momento da observação (Paulus et al. 2003a). Outros métodos baseados em cultivo e que detectam o micélio do fungo nos tecidos internos do substrato (método indireto), fornecem uma maior diversidade de fungos por unidade de substrato comparado ao método direto (Bills & Polishook 1994; Paulus et al. 2003a; Paulus et al. 2006).

A técnica de filtração de partículas, como método indireto, tem se mostrado eficiente em isolar um grande número de espécies de fungos associados aos substratos vegetais. Por este método são geradas partículas diminutas do substrato que proporcionam o aumento da superfície de contato com o meio de cultura, favorecendo a chance de recuperação de um maior número de isolados por unidade de área amostrada. Além do aumento da superfície de contato, a pequena extensão da partícula vegetal utilizada poderia reduzir a competição entre os fungos permitindo o desenvolvimento daqueles fungos de crescimento mais lento (Bills & Polishook 1994; Gamboa et al. 2002; Paulus et al. 2006).

Métodos de caracterização e identificação de fungos também têm efeitos significativos sobre a diversidade encontrada. Para a identificação dos fungos crescidos em meio de cultivo é necessário a indução da esporulação, visto que a identificação morfológica é baseada nas características das estruturas reprodutivas. Vários procedimentos foram relatados na literatura para a indução (Paulus et al. 2003b;

Matsushima 1971) e muitos fungos esporulam facilmente sob condições artificiais, enquanto outros permanecem estéreis e desta forma não são identificados pela taxonomia formal. Nesses casos, os isolados estéreis podem ser agrupados em morfotipos baseados em características macro e microscópicas (Bills & Polishook 1994; Polishook et al. 1996; Abreu et al. 2010).

A análise de sequências do DNA tem sido utilizada para determinar a posição taxonômica dos fungos estéreis (Guo et al. 2000) além de verificar se as similaridades morfológicas, na ausência de estruturas reprodutivas, refletem as similaridades no nível genético (Lacap et al. 2003). Guo et al. (2000) verificaram que fungos estéreis de *Livistona chinensi*, foram predominantemente associados aos ascomicetos, usando a região ITS do DNA ribossomal. Lacap et al. (2003) validaram o conceito de morfotipos como grupos taxonômicos, baseado na análise de sequência de DNA ribossomal, de micélios estéreis isolados do *Polygonum multiflorum*.

2.7 Fungos associados a *C. nemorosa* e *V. guianensis*

Algumas espécies do gênero *Clusia* foram investigadas quanto à ocorrência de fungos sapróbios e fitopatogênicos (Barbosa et al. 2009; Ellis 1976; Farr & Rossman 2014; Mendes 1998): *C. alba* Jacq., *C. domingensis* Urb.; *C. grisebachiana* (Planch. & Triana) Alain; *C. gundlachii* Stahl.; *C. insignis* Mart.; *C. krugiana* Urb.; *C. melchiori* Gleason; *C. minor* L.; *C. multiflora* Humb., Bonpl. & Kunth; *C. nemorosa* e *C. rosea* Jacq.; *C. palmicida* Rich. ex Planch. & Triana.

Para *C. nemorosa* há o registro de 46 espécies de fungos relatados nos trabalhos de Barbosa et al. (2009), Ellis (1976) e Gusmão (2004). Barbosa et al. (2009) investigaram os fungos associados ao folheto na Serra da Jibóia e os autores registraram 44 espécies. Ellis (1976) relatou o fungo *Stigmina clusiae* atuando como decompositor de ramos em Trindade e Tobago, e Gusmão (2004) registrou o fungo *Ochroconis humicola* sobre folhas em decomposição em Lençóis.

Sobre o gênero *Vismia* há registros de fungos associados para as espécies (Farr & Rossman 2014; Viegas 1961): *V. baccifera* (L.) Reichardt, *V. brasiliensis* Choisy, *V. cearensis* Huber, *V. confertiflora* Spruce ex Reichardt, *V. dealbata* Kunth, *V. ferruginea* Kunth, *V. guianensis* (Aubl) Choisy, *V. guineenses* (L.) Choisy, *V. hamanii* S.F.Blake, *V. latifolia* (Aubl) Choisy, *V. lauriformis* (Lam.) Choisy *V. macrophyla* Kunth, *V. micranta*

Mart. ex A. St.-Hil, *V. obtusa* Spruce ex Reichardt e *V. tomentosa* Ruiz & Pav. Há apenas dois registros para *V. guianensis*: *Pestalotia vismifolia*, na Venezuela (Guba 1961) e *Phyllachora vismiae* (Viegas 1961).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

O estudo foi realizado em três remanescentes de Mata Atlântica inseridos na região do semiárido: Serra da Ibiapaba (CE), Brejo Paraibano (PB) e Serra da Jibóia (BA) (Figura 5 e Figura 6).

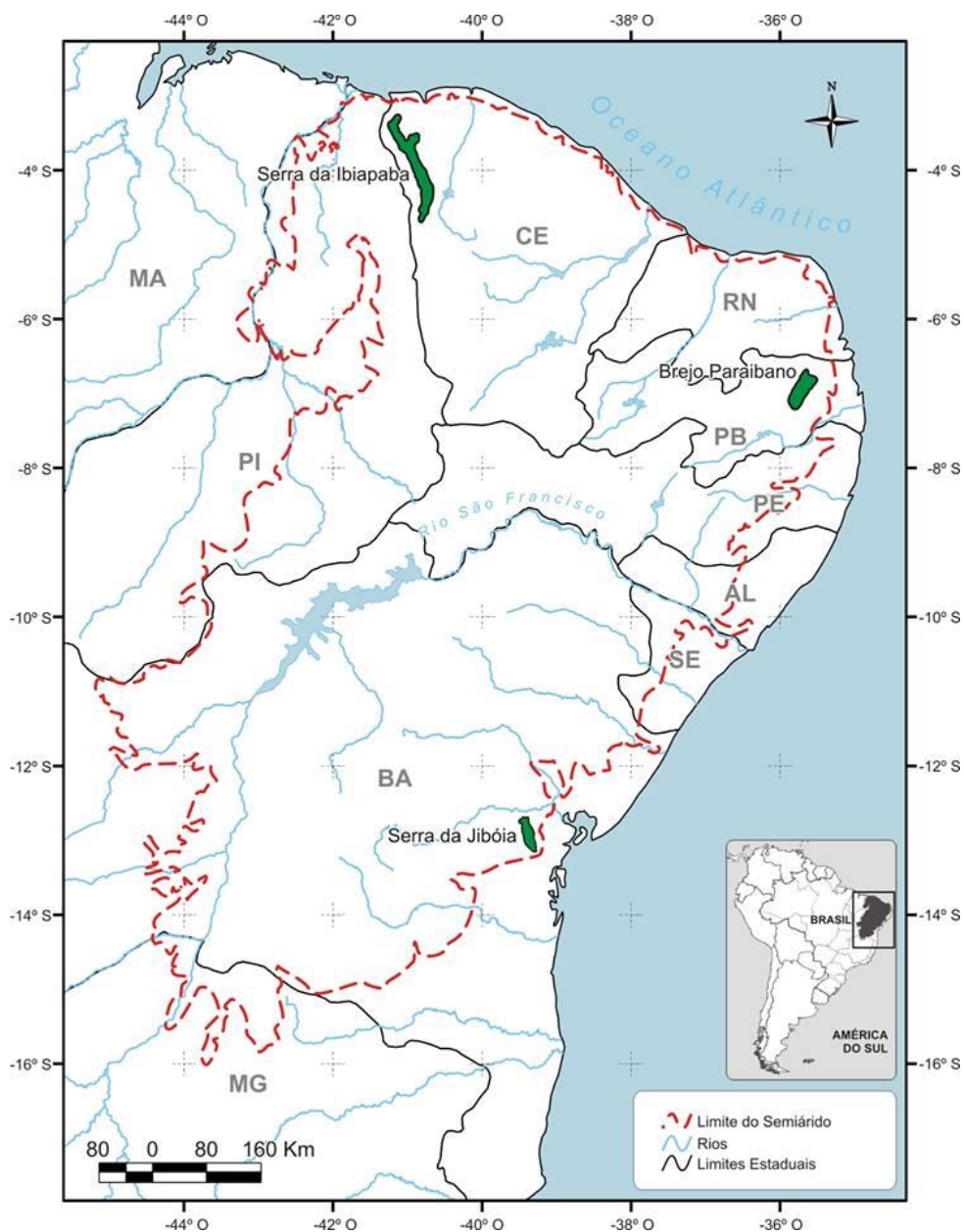


Figura 5. Localização geográfica dos remanescentes de Mata Atlântica investigados no estudo: Serra da Ibiapaba (CE), Brejo Paraibano (PB) e Serra da Jibóia (BA).

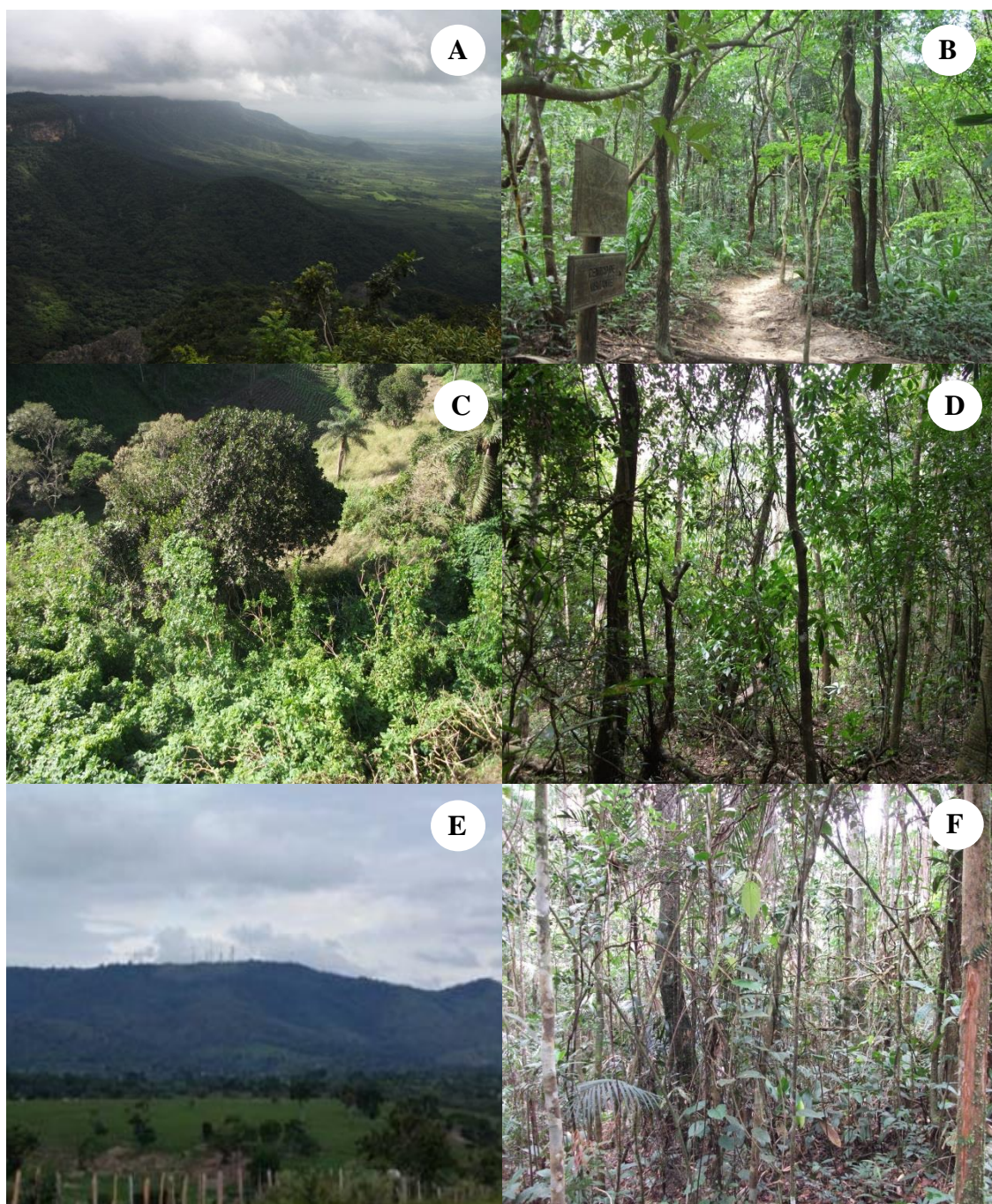


Figura 6. Locais de coleta: (A, B) Visão geral do Parque Nacional de Ubajara (Serra da Ibiapaba) e interior da mata. (C, D) Visão geral da Reserva Ecológica Mata do Pau Ferro (Brejo Paraibano) e interior da mata. (E, F) Visão geral do Monte da Pioneira (Serra da Jibóia) e interior da mata. Fotos: Davi Almeida.

3.1.1 Serra da Ibiapaba

A Serra da Ibiapaba inicia-se a 40 Km do litoral e atravessa de norte a sul o extremo oeste do estado do Ceará, no limite com o estado do Piauí, representando a borda oriental da bacia sedimentar do Parnaíba (Santos & Souza 2012). Abrange uma área de aproximadamente 1.960 km² e altitude variando de 800-1.100 m acima do nível do mar, a Serra da Ibiapaba se estende ao longo dos municípios de Carnaubal, Croatá, Guaraciaba do Norte, Ibiapina, São Benedito, Tianguá, Ubajara, Viçosa do Ceará e outros lugarejos (Figueiredo 1997) (Figura 7).

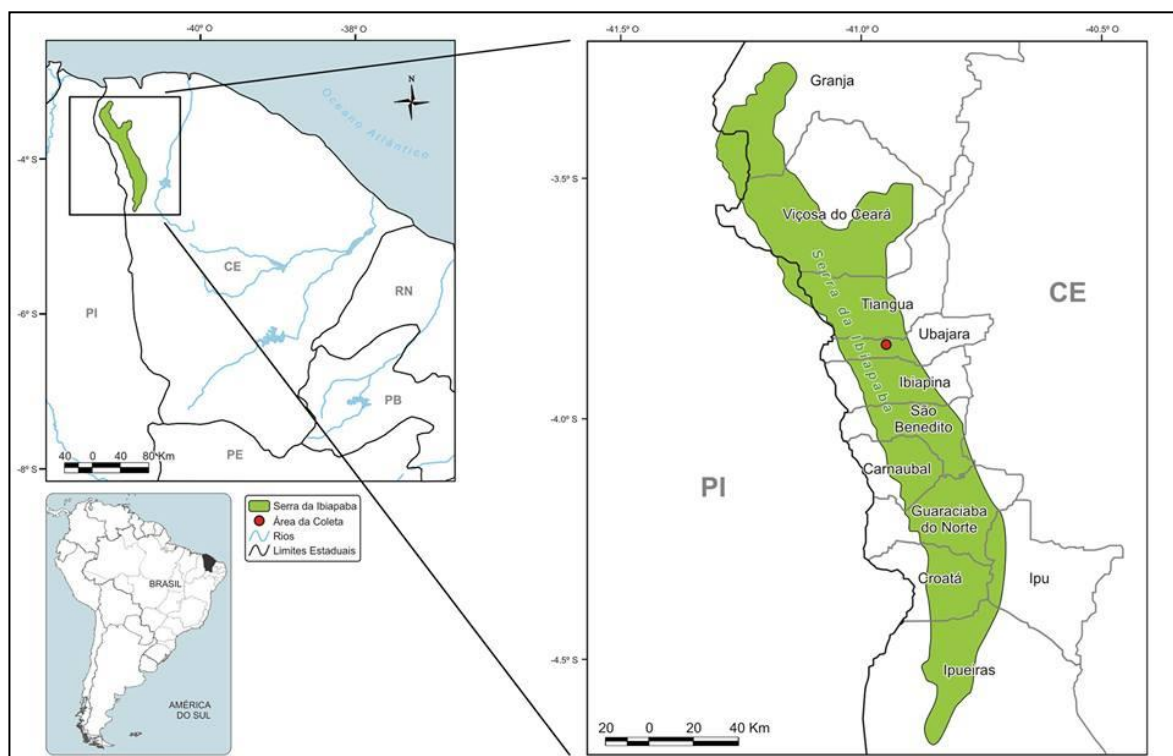


Figura 7. Localização da Serra da Ibiapaba no estado do Ceará e delimitação da área de coleta.

No que se refere ao relevo, a Serra da Ibiapaba é dissimétrica apresentando uma feição cuseiforme (constituída de reverso, frente e cornija) com um reverso suave em direção oeste e um *front* escarpado para leste. A camada superficial da serra, cornija, é constituída de rochas do tipo arenito. A partir dessas rochas formam-se os solos arenosos profundos (Neossolos Quartzarênicos), e solos areno-argilosos muito intemperizados (Latosolos Vermelho-amarelos). Devido às chuvas orográficas no setor setentrional da serra existe a formação de um enclave de mata úmida. No sentido oeste para o sul, o clima

é semiárido e é determinante para os tipos vegetacionais de carrascos e caatingas (Santos & Souza 2012).

As coletas foram realizadas no Parque Nacional de Ubajara (3°46'S e 40°54'O), situado no município de Ubajara (Figura 6A e 6B). O Parque foi criado em 30 de abril de 1959, com área de 563 ha. Em 2002, seus limites foram ampliados e essa unidade de conservação passou a contar com uma área de 6.288 ha (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade 2002).

Devido a sua localização, na vertente leste da Serra da Ibiapaba e atingindo o topo de uma encosta a barlavento, a área onde localiza o Parque caracteriza-se por apresentar dois períodos climáticos bem distintos: um chuvoso e com temperaturas relativamente mais baixas, que ocorre nos meses de janeiro a junho e outro, praticamente sem chuvas que se prolonga de julho a dezembro. A média pluviométrica é considerada elevada para os padrões do Ceará: em 87 anos de observação (1912-1998) foi obtida média de 1 436.3 mm. A temperatura média anual varia entre 20 e 22°C na Serra da Ibiapaba e em torno de 24 a 26°C na depressão periférica. Os meses de junho e julho apresentam, geralmente, temperatura mais amena, enquanto que outubro e novembro destacam-se como os mais quentes do ano (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade 2002).

Segundo Fernandes (1998; *apud* Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade 2002) a vegetação do Parque é formada por duas unidades fitogeográficas: floresta de mata úmida serrana (arboreto climático perenifólio) e floresta de mata seca (arboreto climático estacional semi-caducifólio). A floresta de mata úmida está localizada sobre os setores mais elevados da serra, onde existem ainda remanescentes da primitiva floresta tropical pluvial. A floresta de mata seca ocupa os níveis inferiores da vertente e constitui o tipo de vegetação mais predominante no Parque (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade 2002).

A área do Parque Nacional de Ubajara apresenta-se conservada em meio à Serra da Ibiapaba já bastante devastada devido às ações antrópicas, principalmente com as atividades da agricultura e o desmatamento indiscriminado (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade 2002). Apesar da proteção garantida por lei, na prática há alguns problemas relacionados à coleta indevida de plantas, principalmente na área entorno, e a presença de lixo doméstico jogado nas trilhas ecoturísticas ou trazido pelo vento de áreas vizinhas. Esta área foi designada pelo Ministério de Meio Ambiente (2000)

como sendo prioritária para a conservação da biodiversidade florística da Mata Atlântica presente na região.

3.1.2 Brejo Paraibano

O Brejo Paraibano localiza-se predominantemente na borda úmida oriental do Planalto da Borborema, estendendo-se no sentido norte-sul, por 62 km, e no sentido leste-oeste, por 40 km. Com uma área de aproximadamente 1 174 km² e altitude variável entre 400-600 m acima do nível do mar, o Brejo Paraibano distribui-se por oito municípios: Alagoa Grande, Alagoa Nova, Areia, Bananeiras, Borborema, Pilões, Serraria e Matinhas (Barbosa et al. 2004) (Figura 8).

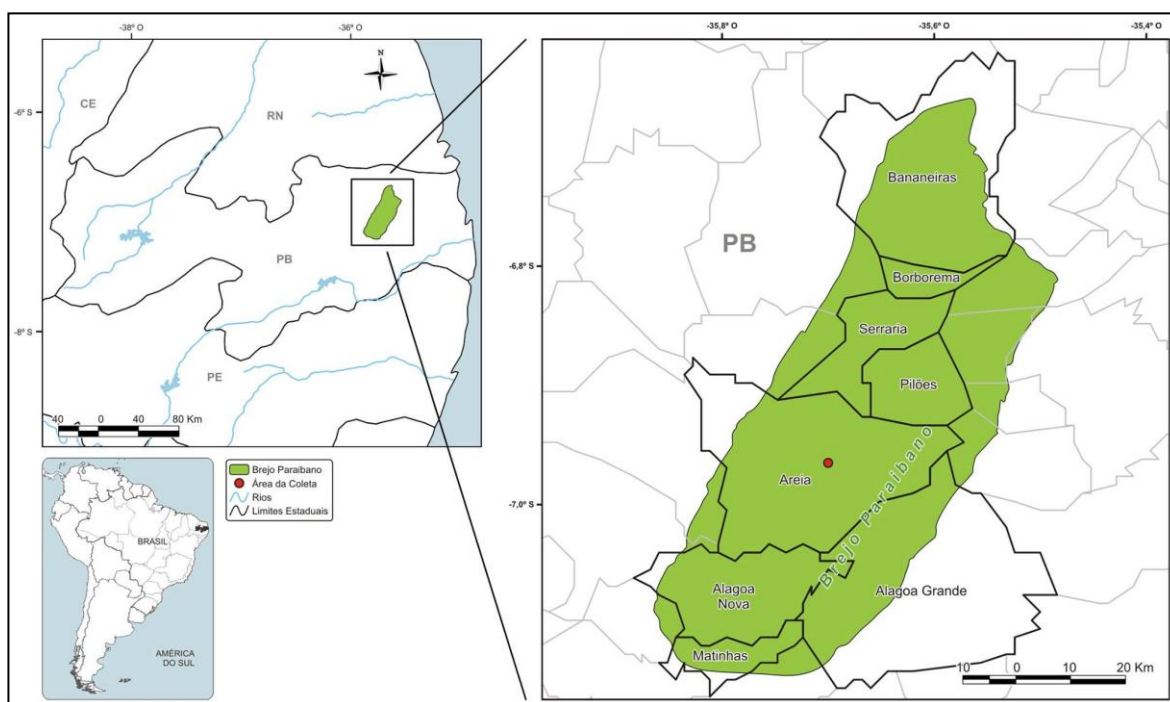


Figura 8. Localização do Brejo Paraibano no estado da Paraíba e delimitação da área de coleta.

O relevo da região exerce forte influência sobre o clima, originando chuvas orográficas que ocorrem de janeiro a agosto, sendo mais abundantes nos meses de junho e julho. A temperatura média anual é em torno de 25°C, com os meses de inverno, chegando a atingir temperaturas abaixo de 16°C e umidade relativa do ar entre 80% e 85%; e uma estação seca curta, de 1 a 3 meses de duração (Moreira 1989). Os solos são profundos e variados, podendo ser encontrados desde os latossolos, os podzólicos, os litólicos

eutróficos, os de terra roxa e os regossolos. A vegetação é composta por uma variedade de formações vegetacionais alterando desde a caatinga, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila aberta, floresta ombrófila densa e formações pioneiras (Tabarelli & Santos 2004).

O local onde se realizou o estudo compreende parte da Reserva Ecológica Mata Pau-Ferro, localizado no município de Areia ($6^{\circ}58'S$ e $35^{\circ}42'O$) e apresenta uma área com cerca de 600 ha (Figura 6C e 6D). Sua criação foi realizada em 1992, constituindo-se de uma unidade de conservação de domínio estadual e, segundo Barbosa et al. (2004), é a mata de brejo de altitude mais representativa no estado da Paraíba, sendo considerada pelo Ministério do Meio Ambiente (2000) como uma área de provável importância biológica para a conservação da flora local de Mata Atlântica.

A área sofreu forte pressão antrópica, antes da criação da Reserva, principalmente devido às atividades de agropecuária (Barbosa et al. 2004; Silva et al. 2006). Atualmente, os locais que sofreram elevada degradação estão abandonados formando capoeiras em diferentes estágios sucessionais, alguns deles tomados por gramíneas que impedem ou dificultam o processo de regeneração natural (Barbosa et al. 2004).

3.1.3 Serra da Jibóia

A Serra da Jibóia está localizada na região do Recôncavo Sul do estado da Bahia e é representada por um complexo de morros que se estende ao longo de seis municípios: Castro Alves, Elísio Medrado, Laje, Santa Terezinha, São Miguel das Matas e Varzedo (Neves 2005) (Figura 9). A sua área é de, aproximadamente, 225 km^2 , com uma altitude que varia entre 750-840 m acima do nível do mar. As coletas foram realizadas no Morro da Pioneira (localizado na parte norte da serra), município de Santa Terezinha ($12^{\circ}51'S$ e $39^{\circ}28'O$) (Figura 6E e 6F).

O seu relevo é bastante acidentado com morros profundamente escavados pela drenagem, com vertentes íngremes e convexizadas, onde se observam afloramentos de rochas de origem granítico-gnáissico. Os tipos de solo variam em função da altitude, mas predominam os latossolos e os podzólicos (Tomasoni & Santos 2003).

A Serra da Jibóia localiza-se em uma zona ecótona ou de transição, o que a confere uma grande diversidade de climas, relevos, solos, vegetação e fauna. A crista da serra marca o limite de uma transição climática na região, com um clima variando entre o

tropical úmido, mais ao sudeste e ao leste, e o tropical semiúmido, mais ao norte e a oeste. A temperatura média anual é de 21°C, e o índice pluviométrico anual é de 1 200 mm, apresentando variações em função da altitude, sendo que as chuvas se concentram entre os meses de abril a julho (Tomasoni & Santos 2003).

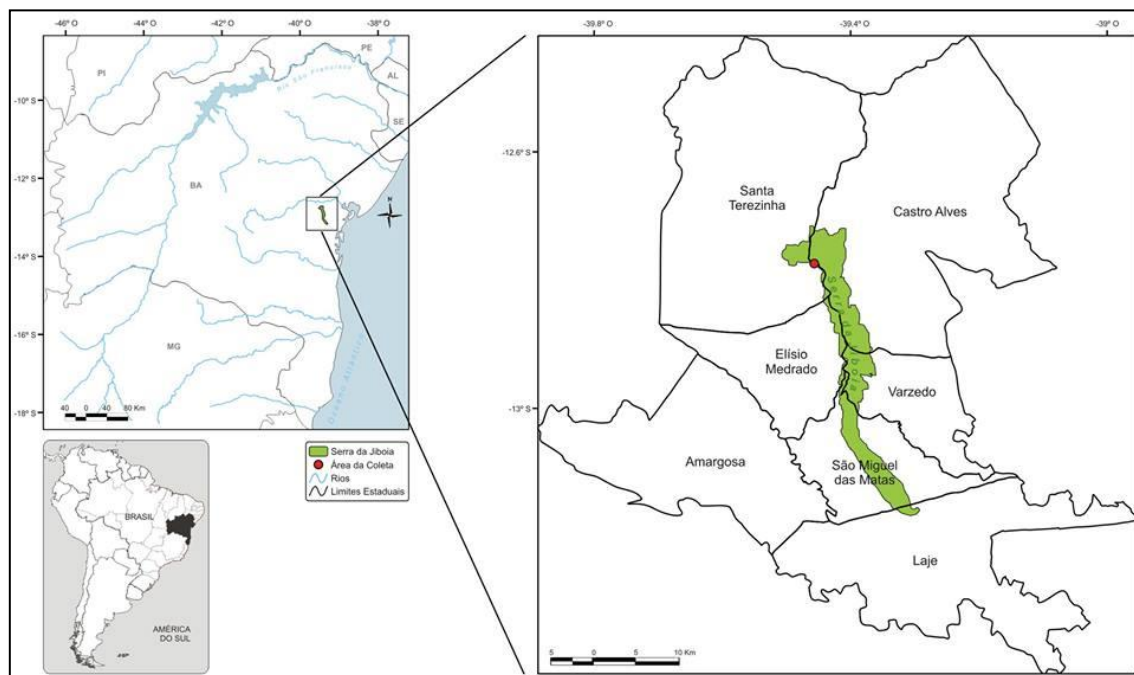


Figura 9. (A) Localização do município de Santa Terezinha no estado da Bahia. (B) Municípios que constituem a Serra da Jibóia, destacando o Morro da Pioneira.

A vegetação local é constituída por um mosaico de formações vegetacionais variando desde o que se desenvolve sobre o afloramento rochoso no ápice; seguido de uma floresta ombrófila densa na porção oriental, devido à influência das chuvas orográficas; floresta estacional semi-decidual e floresta estacional decidual na porção ocidental, por ser menos úmida; e na base caatinga (Tomasoni & Santos 2003).

A Mata Atlântica presente na serra é considerada a mais representativa do Recôncavo Sul da Bahia, abrangendo 32% do remanescente florestal (7.200 ha), e esta área foi determinada pelo Ministério do Meio ambiente (2000) como um remanescente de extrema importância para a conservação da biodiversidade da flora deste bioma.

A Serra da Jibóia abriga um número considerável de espécies novas e endêmicas de plantas, animais e fungos, além de algumas destas espécies encontrarem-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (Ministério do Meio Ambiente 2000). Devido a esta

grande riqueza biológica foi criada em 1999 a Área de Proteção Ambiental Municipal da Serra da Jibóia, que abrange uma área de 3 540 ha, incluindo a parte da serra pertencente ao município de Elísio Medrado. O local que foi realizado o estudo no presente trabalho não constitui uma área com proteção garantida por lei e desta forma vem sofrendo constante degradação ocasionada pelas atividades humanas, principalmente com as queimadas, o desmatamento irracional e o corte ilegal de árvores.

3.2 Expedições de coleta e procedimento de amostragem

Duas expedições de coleta foram realizadas em cada área de estudo, uma durante a estação chuvosa e a outra na estação seca, nos seguintes períodos: abril e novembro/2012 na Serra da Ibiapaba; janeiro e outubro/2012 no Brejo Paraibano; e junho/2011 e janeiro/2013 na Serra da Jibóia. Na primeira expedição três indivíduos de *V. guianensis* foram escolhidos em cada uma das áreas de estudo, levando em consideração a presença e quantidade de folheto disponível em sua base. Apenas na Serra da Jibóia, três indivíduos de *C. nemorosa* também foram amostrados. Todas as plantas foram devidamente marcadas com lacres de segurança (lacre para malote).

Dez folhas da serapilheira foram coletadas abaixo da copa de cada planta, e designadas de uma amostra. Um total de 24 amostras foram coletadas (240 folhas), sendo seis amostras provenientes de *C. nemorosa* e 18 de *V. guianensis*. Em um indivíduo de *C. nemorosa*, amostrado na primeira expedição, 10 folhas adicionais foram coletadas para avaliar os efeitos de aspectos metodológicos sobre a comunidade de fungos. Todas as amostras foram acondicionadas individualmente em embalagens de papel Kraft e, em seguida, transportadas para o Laboratório de Micologia da UEFS (LAMIC) para serem processadas em um período de até 48 horas.

3.3 Avaliação das condições de acondicionamento das folhas sobre a comunidade de fungos

Vinte folhas de um indivíduo de *C. nemorosa* foram divididas em dois tratamentos com 10 folhas cada (A1 e A2). Os tratamentos foram estocados em temperatura ambiente e refrigerada (4°C) e amostras de cada tratamento foram obtidas após 07, 14, 21 e 28 dias (T1, T2, T3 e T4) para investigar o efeito do tempo de acondicionamento. As amostras em cada intervalo de tempo consistiram de 10 fragmentos de 18 cm² (180 cm²), cada unidade

sendo obtida por folha e tratamento. O folheto fresco (folhas não acondicionadas) foi nomeado de T0 e observado em A2. Para comparações entre os tratamentos T0 foi considerado a amostra controle

3.4 Processamento das folhas e isolamento dos fungos

As folhas foram inicialmente lavadas em água corrente e em seguida foram submetidas a um processo de desinfecção superficial com hipoclorito de sódio 5% por dois minutos seguido por três lavagens sucessivas em água destilada estéril (Paulus et al. 2003a). As amostras foram postas para secar em fluxo laminar e posteriormente foram processadas utilizando o protocolo de filtração de partículas descrito por Bills & Polishook (1994) com algumas modificações.

Como as folhas de *C. nemorosa* e *V. guianensis* exibem tamanhos diferentes (folhas maiores - *C. nemorosa*; folhas menores – *V. guianensis*), uma padronização da área foliar foi realizada após o procedimento de desinfecção superficial, para comparação das comunidades de fungos das duas plantas. As folhas de *C. nemorosa* foram subdivididas em cinco áreas, e por sorteio foi retirado um fragmento equivalente à área foliar de *V. guianensis* (Figura 10).

Cada amostra foi triturada por 01 m em 100 mL de água destilada estéril em um liquidificador (Figura 11A). O material particulado foi lavado com jatos de água destilada e filtrado em um conjunto de cinco peneiras com diferentes aberturas de malha (1.0, 0.7, 0.5, 0.25, e 0.18 mm) (Figura 11B). As partículas retidas na peneira de menor abertura foram transferidas para tubos de centrífuga e suspensas em água destilada estéril (completando o volume de 50 mL) (Figura 11C e 11D), em seguida foram agitadas em Vortex por um minuto e colocadas para decantar (Figura 11E). O sobrenadante foi descartado e o tubo foi completado com água destilada estéril até o volume de 50 mL. Este procedimento foi realizado por quatro vezes e o material residual foi ressuspensionado em 20 mL de água destilada estéril (Figura 11F). Alíquotas de 50µl da suspensão foram transferidas e homogeneizadas com o auxílio de uma alça de Drigalski em triplicatas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro (Figura 11G e 11H).

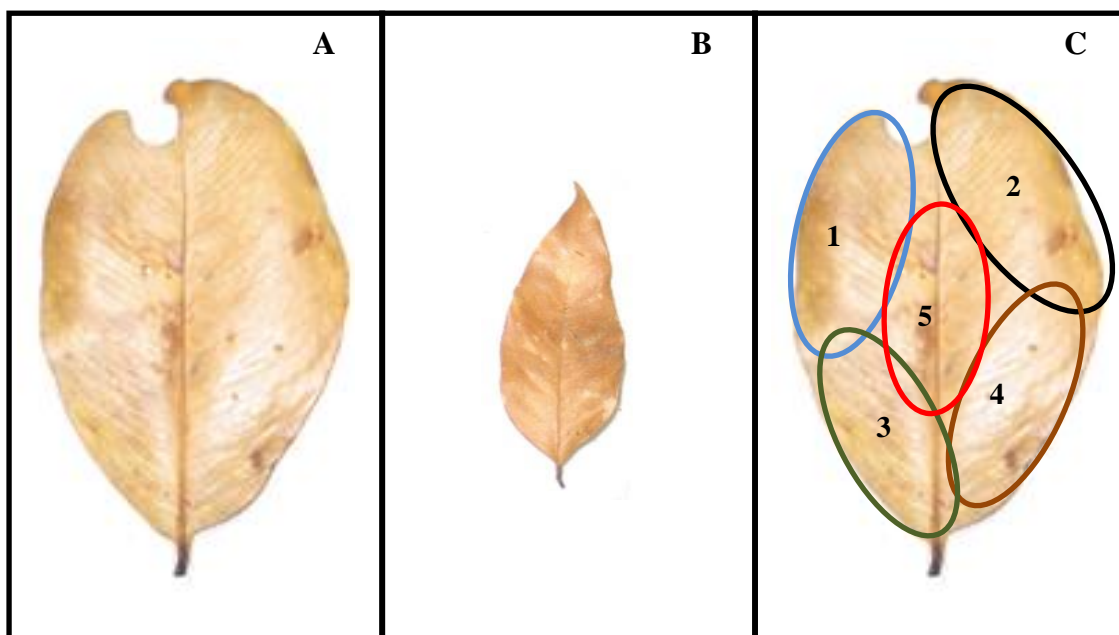


Figura 10. (A) Folha de *Clusia nemorosa*. (B) Folha de *Vismia guianensis*. (C) Subdivisão das áreas na folha de *C. nemorosa*.

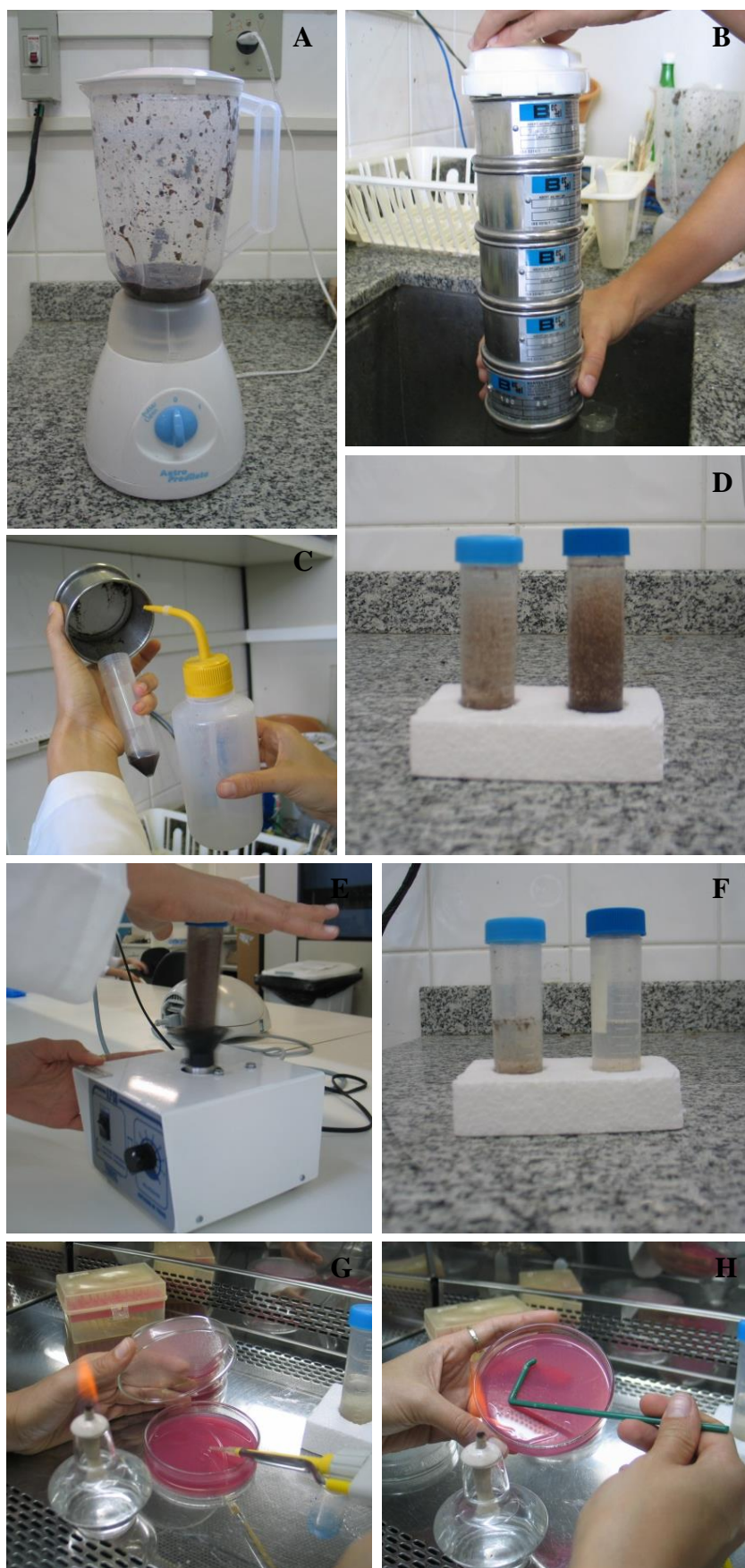


Figura 11. Etapas do processamento das folhas para o isolamento dos fungos sapróbios segundo a metodologia de Bills & Polishook (1994) com adaptações.

3.5 Meios de cultura e incubação

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar dicloran rosa bengala e cloranfenicol (DRBC) sem a adição do dicloran e ágar extrato de malte e levedura (MYE) suplementado por rosa bengala (25 mg/L) e cloranfenicol (100mg/L) (Paulus et al. 2003a).

Após a transferência da suspensão de partículas as placas foram incubadas em condições de temperatura e luminosidade ambiente. O crescimento micelial dos fungos foi observado diariamente, a partir do segundo dia até 30º dia de incubação, e uma vez verificado o crescimento de hifas das partículas, estas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar fubá de milho e cenoura descrito por Castañeda-Ruiz (comunicação pessoal), acrescidos de fragmentos de folhas de bananeira esterilizadas (Matsushima 1971; Paulus et al. 2003b). Este procedimento foi realizado para indução da fase reprodutiva dos fungos isolados e/ou caracterização em morfotipos (Lacap et al. 2003).

3.6 Caracterização e preservação dos fungos

Após um período de, aproximadamente 10 dias, as culturas axênicas foram analisadas sob estereomicroscópio e revisadas periodicamente até a detecção de estruturas reprodutivas. Verificada as estruturas reprodutivas estas foram transferidas com o auxílio de uma agulha fina para lâminas contendo os meios de montagem: resina PVL (álcool polivinílico + álcool láctico + fenol) (Trappe & Schenck 1982) e/ou ácido láctico. A identificação dos fungos foi efetuada por comparação morfológica e mensurações das estruturas de importância taxonômica com dados presentes em literatura básica e específica.

Os isolados que não esporularam até o período de 20 dias foram cultivados em meios ágar água (WA) e ágar aveia (OA) com fragmentos de folhas de bananeira estéreis (Paulus et al. 2003b). Aqueles isolados que mesmo assim não esporularam foram agrupados em morfotipos baseado em suas características morfológicas como taxa de crescimento, margem da colônia, coloração da superfície e do reverso, elevação e textura do micélio e produção de pigmentos no meio de cultivo (Bills & Polishook 1994; Lacap et al. 2003). Isolados representativos de cada espécie identificada foram preservados pelos métodos de óleo mineral (Buell & Weston 1947) e Castellani (1967) e foram depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB) da UEFES.

3.7 Coleta dos dados ambientais

Os posicionamentos geográficos de cada planta amostrada foram determinados com o GPS (Global Positioning System).

Os dados mensais de precipitação pluviométrica, referente ao ano que foram realizadas as expedições de coleta foram fornecidos pela Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUCEME 2010), para o Parque Nacional de Ubajara e pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET 1992), para a Reserva Ecológica da Mata Pau-Ferro. Para o Monte da Pioneira os dados foram fornecidos pela Reserva Jequitibá, com sede em Elísio Medrado.

3.8 Análise dos dados

Todos os fungos isolados foram registrados em planilhas e quantificados por espécie de planta, variáveis metodológicas (tempo e temperatura de acondicionamento e meios de cultura), estação climática e remanescente de Mata Atlântica. Para as análises dos dados, conjuntos distintos de análises estatísticas foram utilizados segundo os objetivos propostos em cada capítulo da tese.

No capítulo I foram avaliados efeitos de condições de acondicionamento do folheto, como tempo e temperatura, e uso de dois meios de cultura, sobre a comunidade de fungos por meio de testes de significância (teste-t e ANOSIM); análise de covariância (ANCOVA); índices de diversidade (Shannon e Simpson); e pelo método multivariado por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS).

No capítulo II, para a comparação entre as comunidades de fungos de *C. nemorosa* e *V. guianensis* além de verificar o efeito da sazonalidade sobre a diversidade, foram realizados a construção de curvas de rarefação, análise de agrupamento, método multivariado NMDS, teste de permutação ANOSIM e a análise de percentagem de similaridade (SIMPER).

No capítulo III foi investigado a distribuição espacial e temporal da comunidade de fungos de *V. guianensis* presente nos três remanescentes por meio das curvas de rarefação, índice de diversidade de Simpson, estimador de riqueza Chao1, análise de agrupamento utilizando o método UPGMA; teste de permutação ANOSIM, método de ordenação NMDS e análise de percentagem (SIMPER).

As análises foram conduzidas nos programas Biodiversity Pro 2 (Mc Aleece, 1997), PAST v. 3.01 (Harmer et al. 2013), R 3.01 (R Core Team 2013) utilizando o pacote vegan (Okasen et al. 2013).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.M. de; ALMEIDA, A.R.; SALGADO, M.; PFENNING, L.H. 2010. Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottettii* and its host tree *Tapirira guianensis*. Mycological Progress, 9:559-566.
- ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology. 4 ed. New York: John Wiley, Sons Inc. 869 p.
- ALLEGRUCCI, N.; BUCSINSZKYA, A.M.; ARTURIB, M.; CABELLO, M.N. 2014. Communities of anamorphic fungi on green leaves and leaf litter of native forests of *Scutia buxifolia* and *Celtis tala*: Composition, diversity, seasonality and substrate specificity. Revista Iberoamericana de Micología (doi 10.1016/j.riam.2013.11.002).
- AMORIM, A.M.; JARDIM, J.G.; CLIFTON, B.C.; FIASCHI, P.; THOMAS, W.W.; CARVALHO, A.M.V. 2005. The vascular plants of a forest fragment in southern Bahia, Brazil. Sida, 21: 1727-1752.
- ANDRADE, V.C. de; MARIZ, G.; CAVALCANTI, L.H.; ANDRADE, L.H.C. 2002. Distribuição das espécies do gênero *Clusia* L. (Clusiaceae) Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds). Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco, Recife. Recife: Sectma-fundaj.
- ANDRADE-LIMA, D. 1982. Present-day forest refuges in Northeastern Brazil. In: PRANCE, G.T. (ed.). Biological diversification in the tropics. New York: Columbia University Press. p.: 245-251.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161(2): 105–121.
- ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology, 88: 541-549.
- BARBOSA, M.R.V.; AGRA, M.F.; SAMPAIO, E.V.S.B.; CUNHA, J.P.; ANDRADE, L. A. 2004. Diversidade florística na Mata do Pau Ferro, Areia, Paraíba. In: PÔRTO, K.C.; CABRAL, J.J.P.; TABARELLI, M. (eds.) Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Série Biodiversidade 9. p.: 111-121.
- BARBOSA, F.R.; MAIA, L.C.; GUSMÃO, L.F.P. 2009. Fungos conidiais associados ao folheto de *Clusia melchiorii* Gleason e *C. nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) em fragmento de Mata Atlântica, BA, Brasil. Acta Botanica Brasilica, 23(1): 79-84.
- BÁRCENAS-MORENO, G.; GÓMEZ-BRANDON, M.; ROUSK, J.; BÅÅTH, E. 2009. Adaptation of soil microbial communities to temperature: comparison of fungi and bacteria in a laboratory experiment. Global Change Biology, 15:2950–2957.

- BILLS, G.F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: REDLIN, S.C.; CARRIS, L.M.; ST PAUL, M.N. (eds) Endophytic fungi in grasses and woody plants. USA: APS Press, pp 31-65.
- BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D. 1994. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. Mycologia, 86: 187-198.
- BITTRICH, V. 2009. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6841>>. Acesso em: 26.04.2014.
- BITTRICH, V. 2010. Hypericaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25586>>. Acesso em: 26.04.2014.
- BUELL, C.B.; WESTON, W.H. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections fungus cultures. American Journal of Botany, 34: 555-561.
- CABRAL, F. N. 2011. As Clusiaceae Lindl. (Guttiferae Juss) s.s., Calophyllaceae J. Agardh e Hypericaceae Juss. no Parque Nacional do Viruá (Roraima) e biologia reprodutiva de Clusia s.p. (Clusia nitida Bittrich, ined). Dissertação de Mestrado – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. 98 p.
- CAMELO, S.R.P. 2010. Estudos de pré-formulação e formulação de Vismia guianensis (Aubl.) Choisy. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências da Saúde da Universidade federal do Pará. Belém. 163 p.
- CANNON, P.F.; SUTTON, B.C. 2004. Microfungi on wood and plant debris. In: FOSTER, M.S.; BILLS, G.F.; MUELLER, G.M. (eds.). Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. San Diego: Elsevier Academic Press. p.:217-239.
- CARVALHO, V.G. 2012. Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz. São Paulo. 203 p.
- CASTAÑEDA-RUIZ, R.F.; GUARRO, J.; VELÁZQUEZ-NOA, S.; GENE, J. 2003. A new species of *Minimelanolocus* and some Hyphomycetes from rain Forest in Brazil. Mycotaxon, 85:231-239.
- CASTELLANI, A. 1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70:181-184.
- CAVALCANTE, A. 2005. Jardins suspensos no Sertão. Scientific American Brasil. Edição 32.
- CAVALCANTI, D.; TABARELLI, M. 2004. Distribuição das Plantas Amazônico-Nordestinas no Centro de Endemismo Pernambuco: Brejos de Altitude vs. Florestas de Terras Baixas. In: PÔRTO, K.C.; CABRAL, J.J.P.; TABARELLI, M. (eds.) Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Série Biodiversidade 9. p.:285-293.

CETRA, M.; BARRELLA, W.; LANGEANI-NETO, F.; MARTINS, A.G.; MELLO, B.J.; ALMEIDA, R.S. 2012. Fish fauna of headwater streams that cross the Atlantic Forest of south São Paulo state. Check List, 8(3): 421-425.

CHEBEZ, J.C.; HILGERT, N. 2003. Brief history of conservation in the Paraná Forest. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds). The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook. Washington: Island Press.p.: 141-159.

COLLADO, J.; PLATAS, G.; PAULUS, B.; BILLS, G. 2007. High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology, 60:521-533.

CRONQUIST, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.

CRUZ, A.C.R.; GUSMÃO, L.F.P. 2009. Fungos conidiais na Caatinga: espécies associadas ao folhedo. Acta Botanica Brasilica, 23(4): 999-1012.

DIX, N.J. 1985. Changes in relationship between water content and water potential after decay and its significance for fungal successions. Transactions of the British Mycological Society, 85:649–653.

ELLIS, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. 2014. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acessado em 20.06.2014.

FARIAS, J.A.; FERRO, J.N.; SILVA, J.P.; AGRA, I.K.; OLIVEIRA, F.M.; CANDEA, A.L.; CONTE, F.P.; FERRARIS, F.K.; HENRIQUES, MD.; CONSERVA, L.M.; BARRETO, E. 2012. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *Clusia nemorosa* both in vitro and in vivo animal models. Inflammation, 35(2):764-71.

FEINSTEIN, L.M; BLACKWOOD, C.B. 2013. The spatial scaling of saprotrophic fungal beta diversity in decomposing leaves. Molecular Ecology, 22:1171–1184.

FIGUEIREDO, M. A. 1997. A cobertura vegetal do Ceará (Unidades Fitoecológicas). In: Atlas do Ceará. Fortaleza: I Plance. p.: 28-29.

FRAGA, M.E.; BRAZ, D.M.; ROCHA, J.F.; PEREIRA, M.G.; FIGEIREDO, D.V. 2012. Interação microrganismo, solo e flora como condutores da diversidade na Mata Atlântica. Acta Botanica Brasilica, 26(4): 857-865.

FUCEME, Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. 2010. Fortaleza, Ceará. Disponível em: < <http://www.funceme.br/>>. Acessado em: 20 de dezembro de 2014.

GAMBOA, M.A., LOUREANO, S.; BAYMAN, P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? Mycopathologia, 156: 41-45.

- GIEBELMANN, U.C. 2011. Litter decomposition in the Atlantic Rainforest of Brazil. Tese de doutorado - Departamento de Biologia da Universidade de Marburgo. Marburgo, Alemanha. 95p.
- GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ, L.P.de. 2006. O Instituto do Milênio do Semi-árido (IMSEAR), Brasil (2002-2006). In: GUSMÃO, L.F.P. & MAIA, L.C. (eds.) Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido brasileiro. Recife: Associação Plantas do Nordeste. p.: 5-10.
- GRAÇA, M.A.S., BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M.O. (EDS.). 2005. Methods to study litter decomposition: a practical guide. Netherlandas: Springer. 314p.
- GRYGANSKYI, A.P.; HUMBER, R.A.; SMITH, M.E.; MIADLIKOWSKA, J.; WU, S.; VOIGT, K.; WALTHER, G.; ANISHCHENKO, I.M.; VILGALYS, R. 2012. Molecular phylogeny of the Entomophthoromycota. Molecular Phylogenetics and Evolution, 65:682-694.
- GUBA, E.F. 1961. Monograph of Monochaetia and Pestalotia. Cambridge: Harvard Univ. Press. 342 p.
- GUO, L.D.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. New Phytologist, 147:617-630.
- GUSMÃO, L.F.P. 2004. Microfungos associados a folhas em decomposição de plantas nativas de Campos Rupestres do Estado da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GUSMÃO, L.F.P.; LEÃO-FERREIRA, S.M.; MARQUES, M.F.O.; ALMEIDA, D.A.C. 2008. New species and records of *Paliphora* from the Brazilian semi-arid region. Mycologia, 100:306-309.
- GUSMÃO, L.F.P.; BARBOSA, F.R.; BARBOSA, F.F. 2006. Fungos conidiais. In: GUSMÃO, L.F.P.; MAIA, L.C. (eds.) Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido brasileiro. Recife: Associação Plantas do Nordeste. p.:161-201.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2013. Paleontological statistics. Versão 3. Disponível em: <<http://www.folk.uio.no/ohammer/past>>.
- HÄTTENSCHWILER, S.; FROMIN, N.; BARANTAL, S. 2011. Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. Comptes Rendus Biologies, 334:393-402.
- HAWKSWORTH, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycological Research, 95: 641-655.
- HAWKSWORTH, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised. Mycological Research, 105: 1422-1432.

HAWKSWORTH, D.L. 2012. Global species numbers off ungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? Biodiversity and Conservation, 21:2425-2433.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.M. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8th edition. Wallingford: CAB International.

HAWKSWORTH, D.L.; MUELLER, G.M. 2005. Fungal communities: their diversity and distribution. In: DIGHTON, J.; WHITE JR., J.F. OUDEMANS, P. (eds.). The fungal community: its organization and role in the ecosystem. 3 ed. Flórida: Taylor & Francis Group. 966p.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, T.H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAIR, Y.C.; GAMS, H.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIĄDLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASO, E.; REEB, V. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological Research, 111:509-547.

HUANG, C.Q.; KIM, S.; SONG, K.; TOWNSHEND, J.R.G.; DAVIS, P.; ALTSTATT, A.; RODAS, O.; YANOSKY, A.; CLAY, R.; TUCKER, C.J.; MUSINSKY, J. 2009. Assessment of Paraguay's Forest cover change using landsat observations. Global and Planetary Change, 67:1-12.

HYDE, K.D. 2001. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? Mycological Research, 105(12):1514-1518.

HYDE, K.D.; BUSSABAN, B.; PAULUS, B.; CROUS, P.W.; LEE, S.; MCKENZIE, E.H.C.; PHOTITA, W.; LUMYONG, S. 2007. Diversity of saprobic microfungi. Biodiversity and Conservation, 16:7-35.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. 1992. Brasília, Goiás. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. 2002. Parque Nacional de Ubajara: Análise da Unidade de Conservação. Plano de manejo-fase 2. Encarte 5.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 2008. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. 10 ed. Wallingford: CABI. 2008.

- KODSUEB, R.; MCKENZIE, E.H.C.; LUMYONG, S.; HYDE, K.D. 2008a. Fungal succession on woody litter of *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). Fungal Diversity, 30: 55-72.
- KODSUEB, R.; MCKENZIE, E.H.C.; LUMYONG, S.; HYDE, K.D. 2008b. Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. Fungal Diversity, 30:37-53.
- KUBARTOVÁ, A.; RANGER, J.; BERTHELIN, J.; BEGUIRISTAIN, T. 2009. Diversity and decomposing ability of saprophytic fungi from temperate forest litter. Microbial Ecology, 58:98-107.
- KUMAR, R.; TAPWAL, A.; BARUAH, D.M. 2012. Leaf litter decomposition pattern in *Dipterocarpus tuberculatu* and *Dipterocarpus retusus* forests of North East India. Research Journal of Forestry, 6: 24-31.
- LACAP, D.C.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. 2003. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. Fungal Diversity, 12: 53-66.
- LODGE, D.J. 1997. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. Biodiversity and Conservation, 6:681-688.
- LODGE, D.J.; CANTRELL, S. 1995. Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. Canadian Journal of Botanic, 73(S1): S1391-S1398.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum. p. 512.
- MAGALHÃES, D.M.A.; LUZ, E.D.M.N.; MAGALHÃES, A.F.; FILHO, L.P.S.; LOGUERCIO, L.L.; BEZERRA, J.L. 2011. Riqueza de fungos anamorfos na serapilheira de *Manilkara maxima*, *Parinari alvimii* e *Harleyodendron unifoliolatum* na Mata Atlântica do Sul da Bahia. Acta Botanica Brasilica, 25(4):899-907.
- MAGURRAN, A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princeton University Press. p. 179.
- MASON, C.F. 1980. Decomposição. Ed. Universidade de São Paulo. Ed. Pedagógica Universitária, v. 18, São Paulo. 63 p.
- MATSUSHIMA, T. 1971. Microfungi of the Solomos Islands and Papua-New Guinea. Japan: Nippon Printing.
- McALEECE, N., 1997. Biodiversity Profesional Beta I. The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science, London.
- MEGURO, M.; VINUEZA, G.N.; DELITTI, W.B.C. 1980. Ciclagem de nutrientes minerais na mata mesófila secundária - São Paulo. III - Decomposição do material foliar e liberação dos nutrientes minerais. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 8:7-20.
- MELO, A. S. 2008. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? Biota Neotropica, 8(3):21-27.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L. da; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. 1998. Fungos em Plantas no Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. 2005. Nova delimitação do semi-árido brasileiro. Brasília: SPDR. 32p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2000. Avaliações de áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e dos campos sulinos. Brasília: Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata atlântica e Fundação Biodiversitas. 40p.

MITTERMEIER, R.; GIL, P.R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.D.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. 2005. Hotspots Revisited: Earth's 7 biologically richest and most endangered ecoregions. Mexico City: CEMEX & Agrupacion Sierra Madre, 640 pp.

MONKAI, J.; PROMPUTTHA, I.; KODSUEB, R.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. 2013. Fungi on decaying leaves of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* show litter fungi to be hyperdiverse. Mycosphere, 4(2), 292–301.

MONTEIRO, J.S.; GUSMÃO, L.F.P. 2013. An emendation of *Fusticeps* and two new species from the Brazilian Amazon Forest. Mycotaxon, 123:431-437.

MORATH, S.U.; HUNG, R.; BENNETT, J.W. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis. Fungal Biology Reviews, 26:73-83.

MOREIRA, E.A. 1989. A natureza do espaço paraibano. João Pessoa: DGEOC/UFPB.

MUTHUKRISHAN, S.; SANJAYAN, K.P.; JAHIR, H.K. 2012. Species composition, seasonal changes and community ordination of alkalotolerant micro fungal diversity in a natural scrub jungle ecosystem of Tamil Nadu, India. Mycosphere, 3(2):92-109.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403:853-858.

NASCIMENTO, L.D.; RODAL, M.J.N.; SILVA, A.G. 2012. Florística de uma floresta estacional no Planalto da Borborema, nordeste do Brasil. Rodriguésia, 63(2): 429-440.

NEVES, M.L.C. 2005. Caracterização da vegetação de um trecho de Mata Atlântica de Encosta na Serra da Jibóia, Bahia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana. Bahia. 135p.

OKASEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M H.H.; WAGNER, H. 2013. Vegan: Community ecology package. R package version 2.0-8.

OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.M.; BITTRICH, V.; VENCATO, I.; MARSAIOLI, A.J. 1996. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. Tetrahedron Letters, 37(36):6427-6430.

PASQUA, G.; MONACELLI, B.; CUTERI, A.; SPUNTARELLI, F.; RASCIO, N.; BOTTA, B.; DELLE MONACHE, G.; SCURRIA, R. 1995. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* D.C. Protoplasma, 189(1-2):9-16.

PAULUS, B.C.; GADEK, P.; HYDE, K. 2003a. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. Mycological Research, 107:748-756.

PAULUS, B.C.; GADEK, P.; HYDE, K.D. 2003b. Two new species of *Dactylaria* (anamorphic fungi) from Australian rainforests and an update of species in *Dactylaria* sensu lato. Fungal Diversity, 14: 143-156.

PAULUS, B.C.; KANOWSKI, J.; GADEK, P.A.; HYDE, K.D. 2006. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. Mycological Research, 110: 1441-1454.

PIEPENBRING, M.; HOFMANN, T.A.; UNTERSEHER, M.; KOST, G. 2012. Species richness of plants and fungi in western Panama: towards a fungal inventory in the tropics. Biodiversity and Conservation, 21:2181-2193.

POLISHOOK, J.D.; BILLS, G.F.; LODGE, D.J. 1996. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. Journal of Industrial Microbiology, 17: 284-294.

PREWITT, L.; KANG, Y.; KAKUMANU, M.L.; WILLIAMS, M. 2014. Fungal and bacterial community succession differs for three wood types during decay in a forest soil. Microbial Ecology, (doi 10.1007/s00248-014-0396-3).

PROMPUTTHA I.; HYDE, K.D.; MCKENZIE, E.H.C.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. 2010. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? Fungal Diversity, 41:89-99.

RAMBELLI, A.; MULAS, B.; PASQUALETTI, M. 2004. Comparative studies on microfungi in tropical ecosystems in Ivory Coast forest litter: behavior on different substrata. Mycological Research, 108(3):325-336.

R CORE TEAM. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

REIS, P.C.J.; ROCHA, W.D.; FALCÃO, L.D.A.; GUERRA, T.J.; NEVES, F.S. 2013. Ant fauna on *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) trees in an Atlantic Forest area, southeastern Brazil. Sociobiology, 60(3):222-228.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. 2009. The brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation, 142:1141-1153.

RUHFEL, B.R.; BITTRICH, V.; BOVE, C.P.; GUSTAFSSON, M.H.G.; PHILBRICK, C.T.; RUTISHAUSER, R.; XI, Z.; DAVIS, C.C. 2011. Phylogeny of the Clusioid clade

(Malpighiales): Evidence from the plastid and mitochondrial genomes. American Journal of Botany, 98(2):1-20.

SANTOS, A.M.M.; CAVALCANTI, D.R.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. Journal of Biogeography, 34:437-446.

SANTOS, F.L.A.; SOUZA, M.J.N. 2012. Caracterização geoambiental do planalto cuestiforme da Ibiapaba, Ceará. Eixo temático: geomorfologia e cotidiano. Revista Geonorte, 2(4):301-309.

SARKAR S. 2010. Diversity: A philosophical perspective. Diversity, 2:127-141.

SAYER, E.J. 2006. Using experimental manipulation to assess the roles of leaf litter in the functioning of forest ecosystems. Biological Review, 81:1-31.

SEEPHUEAK, P.; PHONGPAICHIT, S.; HYDE, K.D.; PETCHARAT, V. 2011. Diversity of saprobic fungi on decaying branch litter of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Mycosphere, 2(4):307-330.

SHANTHI, S.; VITTAL, B.P.R. 2012. Fungal diversity and the pattern of fungal colonization of *Anacardium occidentale* leaf litter. Mycology, 3(2):132-146.

SHENOY, B.D.; JEEWON, R.; HYDE, K.D. 2007. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. Fungal Diversity, 26:1-54.

SILVA, J.M.C.; CASTELETI, C.H.M. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds.). The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. Washington: CABS & Island Press. p.:43-59.

SILVA, A. F.; FILHO, H. F. L. 1982. Composição florística e estrutura de um trecho da mata atlântica de encosta no município de Ubatuba (São Paulo, Brasil). Revista Brasileira de Botânica, 5: 43-52.

SILVA, M.C.; QUEIROZ, J.E.R.; ARAUJO, K.D.; JR, E.P. 2006. Condições ambientais da Reserva Ecológica Estadual da Mata do Pau Ferro, Areia, PB. Geografia, 15(1):51-63.

SILVA, J.M.C.; SOUZA, M.C.; CASTELLETI, C.H.M. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. Global Ecology and Biogeography, 13:85-92.

SOS MATA ATLÂNTICA, 2013. Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br> . Acesso em: 20 de maio de 2014.

STEVENS, P.F. 2012. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 26.04.2014.

TABARELLI, M.; AGUIAR, A.V.; RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; PERES, C.A. 2010. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. Biological Conservation, 143:2328-2340.

- TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. 1999. A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). Revista Brasileira de Botânica, 22: 217-223.
- TABARELLI, M.; SANTOS, A.M.M. 2004. Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos. In: PORTO, K.C.; CABRAL, J.J.P.; TABARELLI, M. (eds.). Brejos de altitudes em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.: 17-24.
- TOMASONI, M.A.; SANTOS, S.D. 2003. Lágrimas da Serra: Os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA Municipal da Serra da Jibóia, no município de Elísio Medrado. Rio de Janeiro: X Simpósio Nacional de Geografia Física Aplicada, Ed. UFRJ, v.1.
- TRAPPE, J.M.; SCHENCK, N.C. 1982. Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizae. In: SCHENCK, N.C. (ed). Methods and principles of Mycorrhizal Research. St. Paul: The American Phytopathological Society. p. 1-9.
- UNTERSEHER, M.; PERŠOH, D.; SCHNITTLER, M. 2013. Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. Fungal Diversity, 60:43-54.
- UNTERSEHER, M.; SCHNITTLER, M. 2009. Dilution to extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.)- different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. Mycological Research, 113:645-654.
- VASCONCELOS SOBRINHO, J. 1971. As regiões naturais do Nordeste, o meio e a civilização. Recife: Conselho de Desenvolvimento de Pernambuco.
- VELOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C. 2002. Ecorregiões propostas para o Bioma Caatinga. Recife: Associação Plantas do Nordeste, Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil. 76p.
- VIEGAS, A.P. 1961. Índice de fungos da América do Sul. Campinas: Instituto Agrônômico. 961p.
- VOŘÍŠKOVÁ, J.; BALDRIAN, P. 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 7(3):477-86.
- YANNA; HO, W.H.; HYDE, K.D. 2001. Fungal communities on decaying palm fronds in Australia, Brunei, and Hong Kong. Mycological Research, 105(12):1458-1471.
- XIA, J.W.; MA, L.G.; MA, Y.R.; CASTAÑEDA-RUIZ, R.F.; ZHANG, X.G. 2013. *Corynesporopsis curvularioides* sp. nov. and new records of microfungi from southern China. Cryptogamie Mycologie, 34(3):281-288.
- ZHANG, D.; HUI, D.; LUO, Y.; ZHOU, G. 2008. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. Journal of Plant Ecology, 1(2):85-93.

ZHOU, D.; HYDE, K.D. 2001. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. Mycological Research, 105(12):1449-1457.

CAPÍTULO I

Effects of storage conditions and culture media on the saprobic fungi diversity in tropical leaf litter

Artigo submetido à publicação na revista Mycosphere

Effects of storage conditions and culture media on the saprobic fungi diversity in tropical leaf litter

Costa LC¹, Peixoto PEC¹ and Gusmão LPF¹

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Micologia, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44031-460, Feira de Santana, BA, Brazil.

Abstract

The effects of methodological aspects were observed in a community of fungi grown in culture associated with leaf litter of *Clusia nemorosa*, collected in the state of Bahia, northeast of Brazil. We examined the effects of variables as storage time (fresh leaf litter, 07, 14, 21 and 28 days) and temperature (room temperature and 4°C), and culture media (MYE and DRBC) on the diversity of fungi. Protocol of particle filtration was used to achieve the isolation of fungi. A total of 1.113 fungi belonging to 67 taxa were isolated. The analysis of covariance (ANCOVA) indicated that richness and the number of isolates decreased significantly with storage time, but did not vary in relation to culture media. The differences between the communities related to the storage temperatures were not significant based on the results of the t-test. The diversity analysis indicated that storage samples up to 14 days showed no significant differences in the communities when compared to fresh litter. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) shows a tendency of separation between the communities observed in the different temperatures and between the initial storage times and late. The results indicate that in the storage of leaves for up to 14 days no significant changes in the community were observed, however in longer storage periods there was a notable loss in both richness and quantity of fungi.

Key words – diversity - leaf litter - methodological aspects - storage litter - tropical fungi

Introduction

Fungi are hyperdiverse organisms and the global number of species is estimated to range from 1.5 to 3.3 million (Hawksworth 2012). Tropical rainforests are home to a wide diversity of species and leaf litter is one of the major reservoirs (Hawksworth & Rossman 1997). The leaf litter is the most significant part of the plant debris and its decomposition contributes to the maintenance and balance of the ecosystem in the forest through nutrient cycling (Xiaogai et al. 2013). The knowledge of factors that influence the composition and community structure of fungi is important for understanding the dynamics of the decomposition process since the diversity of fungi, associated with environmental conditions and the characteristics of the substrate, has significant effects on the rate of decay (Hättenschwiler et al. 2005, Hättenschwiler et al. 2011).

There are several factors that influence the diversity of the saprobe fungi community. The most important ones seem to be related to the plant species (Paulus et al. 2006, Monkai et al. 2013), intrinsic factors to the study area, such as vegetation composition and climate (Polishook & Bills 1996, Yanna et al. 2001), and the seasonality (Kodsueb et al. 2008, Voříšková et al. 2014). Methodological aspects, used to access the saprobic fungi, also have significant influence on the diversity of the community. For example the sampling effort (Magurran 1988, Bills & Polishook 1994a), methods of pretreatment, storage of plant debris (storage time until processing) (Paulus et al. 2003a), methods for detection and isolation of culturable fungi (Collado et al. 2007, Unterseher et al. 2009) as well as methods used for characterization and identification, are all factors to consider. (Bills & Polishook 1994a, Bills 1996).

The storage of the substrate for subsequent diversity analysis has been commonly performed in many studies, mainly due to the fact that collection areas are in remote sites (Talley et al. 2002) and because of the high volume of material to be processed simultaneously (Bills & Polishook 1994a, Polishook et al. 1996, Parungao et al. 2002). The effects of this procedure on diversity of fungi were assessed by Paulus et al. (2003a) in *Neolitsea dealbata* leaves in a rainforest in Australia. The authors observed that diversity was significantly affected since there was a decrease in richness and number of isolates with the increase in storage time.

The storage temperature may have a considerable influence on the conservation of fungi present in the samples. The storage of the litter at temperatures below 0°C (-15 to -20°C) did not affect the diversity of fungi (Kuter 1986), possibly, because the fungi are adapted to freezing for long periods in their natural harsh winters. In tropical regions, the effects of freezing on the diversity are unknown. In addition the refrigerated temperature (4°C) seems to preserve the diversity of the community, since Bills & Polishook (1994a) obtained high richness as well as quantity of fungal isolates in storage samples of 01 week in Costa Rica. However, the effects on the community were not assessed by the authors.

The saprobe fungi are isolated and quantified using methods where selective culture media are widely used (Paulus et al. 2006, Collado et al. 2007). Such approaches have some advantages over other non-cultivable methods, based on molecular approaches, (Liew et al. 1998, Cuadros-Orellana et al. 2013), since it is possible to perform taxonomic, physiological, genetic and biotechnological studies with the fungal isolates (Morath et al. 2012, Gomes et al. 2013, Jeewon et al. 2013, Stadler et al. 2014). The use of a consortium of different culture media, favoring the detection of a greater diversity of fungi has been suggested by some authors (Cannon & Sutton 2004, Paulus et al. 2006).

Studies on the effects of methodological aspects on fungal communities become important because of the need to develop sampling methods efficient and consistent for conducting inventories and diversity studies, allowing comparisons between leaf litter fungal assemblages. In this paper, we evaluate the effects of storage time and temperature, along with the influence of culture media on the diversity of fungi recovered from decaying leaves in the rainforest.

Material and Methods

Collection of leaves and assessment of the effects of storage conditions

Twenty fallen leaves of a plant of *Clusia nemorosa* G. Mey. were collected in a remnant of the Atlantic Forest in the state of Bahia, in northeastern Brazil (12° 51'S and 39° 28' W) in July/2011. The leaves were placed in paper bag, transported immediately to the laboratory and processed up to 12 h after the collection.

The leaves were divided into two treatment groups with 10 leaves each (A1 and A2). The treatments were stored at room temperature (A1) and 4°C (A2). Samples of each treatment were obtained after 07, 14, 21 and 28 days marked as T1, T2, T3 and T4, respectively to investigate the storage time. The samples in each time interval consisted of 10 pieces of 18 cm² (180 cm²), each unit being obtained by leaf and treatment method. The leaves in each treatment were sampled continuously, in other words, after the removal of samples per time interval the remaining material was stored again in the appropriate treatment until the next sampling in the next time interval. Fresh material (leaf litter no storage) was named T0 and only seen in treatment A2. For comparisons among treatments, T0 from A2 was considered the control sample.

Processing of samples and particle filtration protocol

The leaves of *C. nemorosa* were initially washed in water to remove soil particles and other organisms that are attached to the leaf surface and subjected to a process for surface disinfection according to Paulus et al. (2003a). The samples were taken after this pretreatment procedure and, then, were processed using the method of particle filtration (Bills & Polishook 1994a).

Each sample was homogenized for 01 min in 100 mL of sterile distilled water in a household blender and the particulate material was washed with distilled water jets in a group of five stainless steel sieves with different mesh openings (1.0, 0.7, 0.5, 0.25, and 0.18 mm). The particles retained on the 0.18 mm sieve were transferred to a centrifuge tube and suspended in sterile distilled water (up to a volume of 50 mL), and then were stirred at Vortex for 01 min and allowed to settle. The supernatant was discarded and the tube was filled with sterile distilled water to a volume of 50 mL. This procedure was performed 04 times and the residual material was suspended in 20 mL of sterile distilled water. Aliquots (50µL) of the suspension were transferred and homogenized with the aid of a Drigalski handle in triplicate in Petri dishes of 90 mm diameter containing culture media.

Culture media

Two culture media were used for the isolation of the fungi: agar dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) without dichloran and agar malt yeast extract (MYE) supplemented with rose bengal (25 mg/L) and chloramphenicol (100 mg/L) (Paulus et al.

2003a). The plates were incubated at room temperature with ambient light after the transfer of the particle suspension. The fungal growth was observed daily for 30 days, and once verified that hyphae was present in the particles, they were transferred to Petri dishes containing the culture media cornmeal and carrot agar (CCA) as described by Castañeda-Ruiz (personal communication), together with sterilized fragments of banana leaves (Paulus et al. 2003b). This procedure was performed to induce the reproductive stage of fungi isolated and/or for the characterization of morphotypes (Lacap et al. 2003).

Data analyses

Caculations were made using the t-test in order to compare the number of fungi and richness between treatments A1 and A2. The evaluation of the effects of storage time and culture media in relation to the number of isolates and richness of fungi obtained from each treatment was performed by the analysis of covariance (ANCOVA, Quinn & Keough 2002). The significance level of 5% was established for both analyzes, t-test and ANCOVA.

The diversity of fungal communities in each investigative time was evaluated by Shannon and inverse Simpson indexes, the last one represented as *I-D* (Magurran 1988). The confidence interval of 95% in both indexes was calculated using the bootstrap method (Grünwald et al. 2003). To search for general differences in composition among fungal treatments, the data was analyzed using a multivariate method, specifically the nonmetric multidimensional scaling (NMDS, Kruskal 1964), from the Bray-Curtis dissimilarity matrix. The permutation test ANOSIM (*Analysis of Similarity*) was used to assess the significance of the pattern indicated by the NMDS (Clarke 1993).

The statistical analyses were conducted using softwares: PAST v. 3.01 (Harmer et al. 2013) and R 3.01 (R Core Team 2013) using the vegan package (Okasen et al. 2013).

Results

A total of 1.113 specimens, comprising 67 taxa, were isolated from the leaf litter of *C. nemorosa*. The number of fungi and species richness decreased in relation to storage time in both treatments. In treatment A1, the number of isolates ranged from 40 to 235, and

in relation to richness, ranged from 14 to 43 taxa. In A2, the number of isolates and richness varied from 62 to 235 and from 25 to 43 taxa, respectively. The culture medium DRBC provide the growth of 595 fungi, belonging to 57 taxa, while in MYE 518 specimens represented by 51 fungal taxa were grown (Table 1).

The t-test revealed no differences between treatments (isolated, $t=0.24$, $df=16$, $P=0.81$; richness, $t=0.14$, $df=16$, $P=0.90$). The ANCOVA revealed a negative correlation between the number of isolates and richness of fungi with regards to storage time. The use of both culture media as well as the interaction between the culture media and storage time had no effect on the community of fungi (Table 2).

The Shannon diversity index obtained its maximum at T0 ($H'=3.16$) and decreased in relation to time of storage in both A1 and A2 ($H'=2.22$ and $H'=2.68$, respectively). In A1 the index values were higher compared to the values in A2, except on T4A2 (Table 3). Comparisons of the confidence intervals between T0 and each storage time showed significant differences at T3 and T4. It was considered significant because there was no overlap in values between the confidence intervals (Table 3).

The Simpson index was higher at T0 and T1 having the same values ($1-D=0.94$) and, similar to the Shannon index, decreased in relation to time of storage in both A1 and A2 ($1-D=0.85$ and $1-D=0.89$, respectively) (Table 3). Significant differences between the confidence intervals of indexes were found at T3A2 and T4A1 (Table 3).

Among all samples, only 25 shared taxa were found, between T0 and A1, 31 taxa, between T0 and A2, 30 taxa, and between temperature treatments 32 taxa were observed. It was found that 08 taxa were exclusive to T0, 07 to A1 and 10 to A2 (Table 4). The frequency of the most common taxa decreased with time of storage from 44% in T0 to 24% and 28% in the treatments A1 and A2, respectively (Table 4).

Asexual fungi (hyphomycetes 62.7% + coelomycetes 12% = 74.7%) were isolated more frequently than the sexual stage (9%). Sterile mycelia were observed at a percentage of 16.4%. Three connections of sexual-asexual stages were recorded: *Pseudomassaria carolinensis* (*Beltraniella portoricensis*), *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides* complex) and *Calonectria gracilipes* (*Cylindrocladium graciloideum*). Rare taxa, considering the *singletons* and *doubletons*, accounted for 32.8% of the fungi community that were obtained mostly (81.8%) during the first time intervals of storage (T0

and T1, in both treatments). The fungi more abundant were *Dactylaria belliana* (11%), *P. carolinensis* (7.5%), *Beltrania rhombica* (7%) and *Volutella minima* (6.2%) (Table 4).

The distribution pattern of fungi community among the samples obtained by the ordination method NMDS is shown in Figure 1. The graph shows a tendency of separation between the treatments (A1, below, and A2, above) and between the initial storage times (T1 and T2, left), along with T0, and late (T3 and T4, right). The result of ANOSIM indicated that the differences between the communities were not significant ($R = -0.064$, $P = 0.635$).

Discussion

Although the particle filtration protocol proved to be efficient in the isolation of a significant amount of fungi associated with leaf litter, the richness obtained in this study was lower when compared to other studies in tropical forests using the same technique. Bills and Polishook (1994b) isolated 1.676 fungi and grouped it in 122 morphotypes, from four samples of senescent leaves of *Heliconia mariae*. Polishook et al. (1996) isolated 101 and 173 taxa from a sample of five grams of leaf litter of *Guarea guidonea* and *Manilkara bidentata*, respectively. Paulus et al. (2003a) investigated the fungi in leaf litter of *Neolitsea dealbata* using four samples of five grams, and managed to isolate 736 fungi distributed among 112 taxa.

Despite using the same technique mentioned above, a lower richness was obtained (67 taxa), probably, due to the differences in sampling methods and the characteristics of the substrates of the plants. The samples were determined by leaf area because the weight parameter varies depending of the environmental conditions including the temperature, an extremely important factor. Another fact to be taken into consideration are that the leaves of *C. nemorosa* have a thick cuticle (Fernandes 2007) that acts as a physical barrier that may hinder penetration and colonization of the leaf tissue by some fungi (Canhoto & Graça 1999).

In addition to the sampling method, other methodological factors could contribute to the differences in composition and community structure of culturable fungi. Among the parameters evaluated in the study, the use of distinct culture medium (DRBC and MYE) did not differ in the isolation of fungi. This observation was not supported by Cannon &

Sutton (2004), which reported that the use of selective media favored the detection of a large number of fungi in leaf litter, while the spectrum of selectivity of these culture media are not well known. The culture media used in this study were complex and it is possible that the similarity of some chemical compounds and the final pH favored the growth of a variety of quite similar fungi.

Although the temperature is an important factor that regulates the metabolic activity of fungi (Pietikäinen et al. 2005; van der Wal et al. 2013), its effects on the composition of communities are not well understood and little information is available. The leaf litter stored at room temperature (A1), lost more humidity and was observed to be more dry and brittle during the experiment when compared to the litter stored at 4° C (A2). Although A2 showed a higher number of isolates and an increase in richness there were no significant differences between treatments. These observations indicate that for the storage time evaluated, the storage temperatures showed no different to obtain a higher number fungi.

The parameter that strongly influenced the fungal community was the time of storage of the substrate for further processing (Paulus et al. 2003a). In both treatments A1 and A2, the storage time of 28 days yielded a decrease in both number and richness of fungal isolates. This result corroborated the findings of Paulus et al. (2003a) whose study of fallen leaves of the *Neolitsea dealbata* used storage periods of 01, 07, 21 e 28 days and found that the number of isolates differed significantly in relation to storage time. However the richness was not affected for up to 21 days of storage. Considering that the same leaves were continuously processed, the storage time interval (fresh material to 28 days) may also have contributed to the lower richness found in this study.

The Shannon and Simpson's diversity indices indicated that the diversity of fungi decreases with storage time. However, the Shannon index was more sensitive, indicating that leaves stored up to 14 days had no significant effect on the community. As mentioned above, Paulus et al. (2003a) found no differences in the richness up to 21 days of storage, although the authors did not assess storage leaves for 14 days. The Shannon index values are considered high, because for many studies the index usually ranges between 1.5 (low diversity) and 3.5 (high diversity) (Margalef 1972). The lowest values of Simpson's index (0.85 to 0.89) indicate a community with a greater dominance of taxa.

The result of the NMDS indicated that the observed differences in the number of isolates and taxa richness between the storage time intervals (early and late) and treatments (A1 and A2) could separate communities of fungi, wherein storage initial periods showed higher values compared to later periods. However, this pattern was not confirmed by the ANOSIM test indicating that more samples could be analyzed.

Given the observed community, some species of fungi were detected early in the process (initial storage) (ex. *Fusarium lateridium*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Metarhizium anisopliae*), while others were found during the later periods of storage (ex. *Ardachandra selenoides*, *Trichoderma* sp. e *Volutella minima*). The dynamics of the species composition and structure of communities associated with litter indicate that some fungi may be more resistant to water stress, which would be present in a dormant or less physiologically state, giving considerable longevity to the fungus under conditions of lower humidity (Dix 1985, Paulus et al. 2003a).

This study indicates that the storage time had a significant effect on the diversity of fungi in leaf litter while the storage temperature and the use of different selective media showed no significant differences in isolation. The diversity of stored leaves for up to 14 days, was substantially similar to the diversity of material no storage, however longer storage periods showed a significant loss pertaining to both richness and abundance of fungi saprobic. Based on these data is important to assess whether changes in fungal diversity are acceptable for the proposed research or if just presence/absence data are needed. If it is important to get a more diverse community, then the isolation of fungi should be performed within 14 days after the collection of fallen leaves.

Acknowledgements

The first author thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the award of a PhD scholarship and the “Programa de Pós-graduação em Botânica – PPGBot/UEFS”. The authors thanks the “Programa de Pesquisa em Biodiversidade no Semiárido – PPBio semiárido” for the financial support and Carolina Azevedo, Lara Almeida and Tasciano Santa Izabel for technical assistance.

References

- Bills GF. 1996 - Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: Redlin SC, Carris LM, St Paul, MN (eds) Endophytic fungi in grasses and woody plants. APS Press, USA, pp 31-65.
- Bills GF, Polishook JD. 1994a - Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia* 86, 187-198.
- Bills GF, Polishook JD. 1994b - Microfungi from decaying leaves of *Heliconia mariae* (Heliconiaceae). *Brenesia* 41, 27-43.
- Canhoto C, Graça MA. 1999 - Leaf barriers to fungal colonization and shredders (*Tipula lateralis*) consumption of decomposing *Eucalyptus globulus*. *Microbial Ecology* 37, 163-172.
- Cannon PF, Sutton BC. 2004 - Microfungi on wood and plant debris. In: Foster MS, Bills GF, Mueller GM (eds). Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier, Amsterdam, pp 217-239.
- Clarke KR. 1993 - Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117-143.
- Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF. 2007 - High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 521-533.
- Cuadros-Orellana S, Leite RL, Smith A, Medeiros JD, Badotti F, Fonseca PLC, Vaz ABM, Oliveira G, Góes-Neto A. 2013 - Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. *Fungal Genetics and Biology* 3, 110. doi:10.4172/2165-8056.1000110.
- Dix NJ. 1985 - Changes in relationship between water content and water potential after decay and its significance for fungal successions. *Transactions of the British Mycological Society* 85, 649-653.
- Fernandes SDC. 2007 - Morfologia, anatomia, histoquímica e aspectos fisiológicos da lâmina foliar de espécies de *Clusia* (Clusiaceae). Dissertation, University of Brasília.

- Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. 2013 - *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31, 1-41.
- Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE. 2003 - Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93(6), 738-746.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2013 - Paleontological statistics. Versão 1.34. <http://www.folk.uio.no/ohammer/past> (accessed 20 February 2014).
- Hättenschwiler S, Fromin N, Barantal S. 2011 - Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. *Comptes Rendus Biologies* 334, 393-402.
- Hättenschwiler S, Tiunov AV, Scheu S. 2005 - Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 191-218.
- Hawksworth DL. 2012 - Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity and Conservation* 21, 2425-2433.
- Hawksworth DL, Rossman AY. 1997 - Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87(9), 888-891.
- Jeewon R, Ittoo J, Mahadeb D, Jaufeerally-Fakim Y, Wang HK, Liu AR. 2013 - DNA based identification and phylogenetic characterisation of endophytic and saprobic fungi from *Antidesma madagascariense*, a medicinal plant in Mauritius. *Journal of Mycology* 2013, 1-10.
- Kodsueb R, McKenzie EHC, Lumyong S, Hyde KD. 2008 - Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. *Fungal Diversity* 30, 37-53.
- Kruskall JB. 1964 - Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29, 115-129.
- Kuter GA. 1986 - Microfungal populations associated with the decomposition of sugar maple (*Acer saccharum*) leaf litter. *Mycologia* 78, 114-126.
- Lacap DC, Hyde KD, Liew ECY. 2003 - An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12, 53-66.

- Liew ECY, Guo LD, Ranghoo VM, Goh TK, Hyde KD. 1998 - Molecular approaches to assessing fungal diversity in the natural environment. *Fungal Diversity* 1, 1-17.
- Magurran AE. 1988 - Ecological diversity and its measurement. Princeton, New Jersey.
- Mann HB, Whitney DR. 1947 - On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18(1), 50-60.
- Margalef R. 1972 - Homage to Evelyn Hutchinson, or why is there an upper limit to diversity. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts* 14, 211-235.
- Monkai J, Promputtha I, Kodsueb R, Chukeatirote E, McKenzie EHC, Hyde KD. 2013 - Fungi on decaying leaves of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* show litter fungi to be hyperdiverse. *Mycosphere* 4(2), 292-301.
- Morath SU, Hung R, Bennett JW. 2012 - Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis. *Fungal Biology Reviews* 26, 73-83.
- Okasen J, Blanchet FG, Kindt R et al. 2013 - Vegan: Community ecology package. R package version 2.0-8.
- Parungao MM, Fryar SC, Hyde KD. 2002 - Diversity of fungi on rainforest litter in North Queensland, Australia. *Biodiversity and Conservation* 11, 1185-1194.
- Paulus BC, Gadek P, Hyde KD. 2003a - Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. *Mycological Research* 107, 748-756.
- Paulus BC, Gadek P, Hyde KD. 2003b - Two new species of *Dactylaria* (anamorphic fungi) from Australian rainforests and an update of species in *Dactylaria* sensu lato. *Fungal Diversity* 14, 143-156.
- Paulus BC, Kanowski J, Gadek PA, Hyde KD. 2006 - Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycological Research* 110, 1441-1454.
- Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. 2005 - Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology* 52, 49-58.
- Polishook JD, Bills GF, Lodge DJ. 1996 - Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 284-294.

- Quinn GP, Keough MJ. 2002 - Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge, New York.
- R Core Team. 2013 - R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org> (accessed 20 February 2014).
- Stadler M, Læssøe T, Fournier J, Decock C, Schmieschek B, Tichy HV, Peršoh D. 2014 - A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). *Studies in Mycology* 77(1), 1-143.
- Talley SM, Coley PD, Kursar TA. 2002 - The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology* 2(7), 1-11.
- Unterseher M, Schnittler M. 2009 - Dilution to extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.)- different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycological Research* 113, 645-654.
- van der Wal A, Geydan TD, Kuyper TW, de Boer W. 2013 - A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 477-494.
- Voříšková J, Brabcová V, Cajthaml T, Baldrian P. 2014 - Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist* 201(1), 269-278.
- Yanna, Ho WH, Hyde KD. 2001 - Fungal communities on decaying palm fronds in Australia, Brunei, and Hong Kong. *Mycological Research* 105(12), 1458-1471.
- Xiaogai G, Lixiong Z, Wenfa X, Zhilin H, Xiansheng G, Benwang T. 2013 - Effect of litter substrate quality and soil nutrients on forest litter decomposition: a review. *Acta Ecologica Sinica* 33, 102-108.

Tables and Figures

Table 1 Numbers of isolated and richness of saprobic fungi on litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature, and culture media

Storage time/ culture media	Number of isolates			Richness		
	A1 (room temp.)	A2 (4°C)	Total	A1 (room temp.)	A2 (4°C)	Total
T0 ^a (fresh material)	235	235	235	43	43	43
T1 (07 days)	152	207	359	35	35	49
T2 (14 days)	113	143	256	28	31	36
T3 (21 days)	60	101	161	20	23	27
T4 (28 days)	40	62	102	14	25	28
Total	600	748	1.113	57	60	67
DRBC	304	408	595	47	49	57
MYA	296	340	518	42	48	51
Total	600	748	1.113	57	60	67

^aThe number of isolates and richness obtained at T0 were repeated in A1 and A2, but the total amount was quantified only once.

Table 2 Analysis of covariance (ANCOVA) of numbers of isolate and richness of saprobic fungi on litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature, and culture media

Treatment	Number of isolates			Richness		
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
A1 (room temp.)						
Culture media	1	0.017	0.901	1	5.691	0.054
Storage time	1	29.847	0.002	1	172.035	0.012
Culture media * storage time	1	0.126	0.735	1	0.844	0.394
Residual	6			6		
A2 (4°C)						
Culture media	1	3.560	0.108	1	0.043	0.842
Storage time	1	78.246	<0.001	1	36.186	<0.001
Culture media * storage time	1	0.004	0.950	1	0.232	0.647
Residual	6			6		

Table 3 Diversity index Shannon and Simpson for saprobic fungi on litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature

Samples ^a	Shannon index (H')	Simpson index ($I-D$)
T0	3.16 (3.03-3.27)	0.94 (0.92-0.95)
T1A1	3.15 (3.03-3.24)	0.94 (0.93-0.95)
T1A2	3.11 (2.99-3.19)	0.94 (0.93-0.95)
T2A1	2.97 (2.83-3.07)	0.93 (0.91-0.94)
T2A2	2.96 (2.83-3.08)	0.93 (0.91-0.94)
T3A1	2.73 (2.51-2.82)	0.92 (0.89-0.93)
T3A2	2.5 (2.43-2.75)	0.87 (0.84-0.91)
T4A1	2.22 (2.15-2.46)	0.85 (0.83-0.90)
T4A2	2.68 (2.56-2.93)	0.89 (0.85-0.93)

^aT0 (fresh material), T1 (07), T2 (14), T3 (21), T4 (28) days of storage; A1 (room temperature) and A2 (4°C).

Table 4 Taxa and number of saprobic fungi on leaf litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature^a

Taxa	T0	A1				A2			
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
<i>Acremonium</i> sp.1	4	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Acremonium</i> sp.2	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Ardhachandra cristaspora</i>	3	0	0	1	0	2	1	0	0
<i>Ardhachandra selenoides</i>	0	0	0	0	0	7	2	0	1
ascomycetes sp.	0	0	0	0	0	7	0	0	0
<i>Atrosetaphiale fragelliformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Beltrania rhombica</i>	29	15	3	1	0	20	8	1	1
<i>Calonectria gracilipes</i>	2	7	1	3	0	3	8	1	1
<i>Chalara</i> cf. <i>paramontellica</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Dactylaria</i> cf. <i>biseptata</i>	4	1	0	0	2	0	1	1	3
<i>Gliocladiopsis</i> cf. <i>elgholli</i>	21	11	2	1	0	0	2	7	1
<i>Gliocladiopsis</i> cf. <i>mexicana</i>	0	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Idriella</i> cf. <i>cubensis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Idriella</i> cf. <i>variabilis</i>	3	2	2	6	1	2	2	2	3
<i>Neofusicoccum</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Scolecobasidiella</i> cf. <i>tropicalis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	10	1	1	0	0	6	1	0	0
<i>Cladosporium</i> -like sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0
coelomycete sp.1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
coelomycete sp.2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindrocladium gracile</i>	5	6	5	8	0	1	7	8	3
<i>Dactylaria belliana</i>	30	9	1	8	7	25	20	5	16

<i>Dictyochaeta novae-guineensis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Dictyochaeta simplex</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Fusarium decemcellulare</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Fusarium lateridium</i>	1	13	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium solani</i>	1	0	0	0	1	2	0	8	4
<i>Glomerella cingulata</i>	10	1	2	0	0	3	11	0	0
hyphomycete sp.	1	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Idriella lunata</i>	5	4	2	0	0	1	0	0	1
<i>Idriella ramosa</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Idriella</i> sp.1	3	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Idriella</i> sp.2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Idriella</i> sp.3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Metarhizium anisopliae</i>	3	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Mycoleptodiscus terrestris</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ochroconis</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ochroconis variabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Parasymptodiella laxa</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	11	7	10	1	0	5	1	0	0
<i>Penicillium mineoluteum</i>	12	0	4	5	0	8	3	6	0
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	4	13	7	1	6	8	3	2	2
<i>Phomopsis</i> sp.1	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis</i> sp.2	2	0	0	0	0	3	1	0	0
<i>Pseudomassaria carolinensis</i>	24	8	7	5	0	14	22	2	1
<i>Satchmopsis brasiliensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Selenodriella fertilis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0

<i>Speiropsis scopiformis</i>	7	1	0	3	1	5	1	2	1
sterile mycelium sp.1	0	1	1	0	0	0	6	1	1
sterile mycelium sp.2	1	1	18	2	3	14	0	0	1
sterile mycelium sp.3	0	4	1	1	3	1	0	1	0
sterile mycelium sp.4	0	3	4	3	0	3	3	4	1
sterile mycelium sp.5	2	4	3	0	0	10	3	1	2
sterile mycelium sp.6	2	0	1	0	0	3	2	0	1
sterile mycelium sp.7	1	3	6	0	1	0	7	0	0
sterile mycelium sp.8	1	0	0	0	0	0	0	0	0
sterile mycelium sp.9	0	1	5	1	1	4	2	1	1
sterile mycelium sp.10	0	2	10	2	1	0	5	1	0
sterile mycelium sp.11	1	9	2	0	0	24	5	2	1
<i>Thozetella cristata</i>	3	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	8	0	1	0	2	0	1
<i>Verticillium</i> sp.	1	3	4	1	0	10	1	13	8
<i>Volutella minima</i>	1	3	1	3	11	4	10	30	6
<i>Wiesneriomyces laurinus</i>	6	0	0	0	0	0	1	0	0
Xylariaceae sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	235	152	113	60	40	207	143	101	62

^aT0 (fresh material), T1 (07), T2 (14), T3 (21), T4 (28) days of storage; A1 (room temperarute) and A2 (4°C)

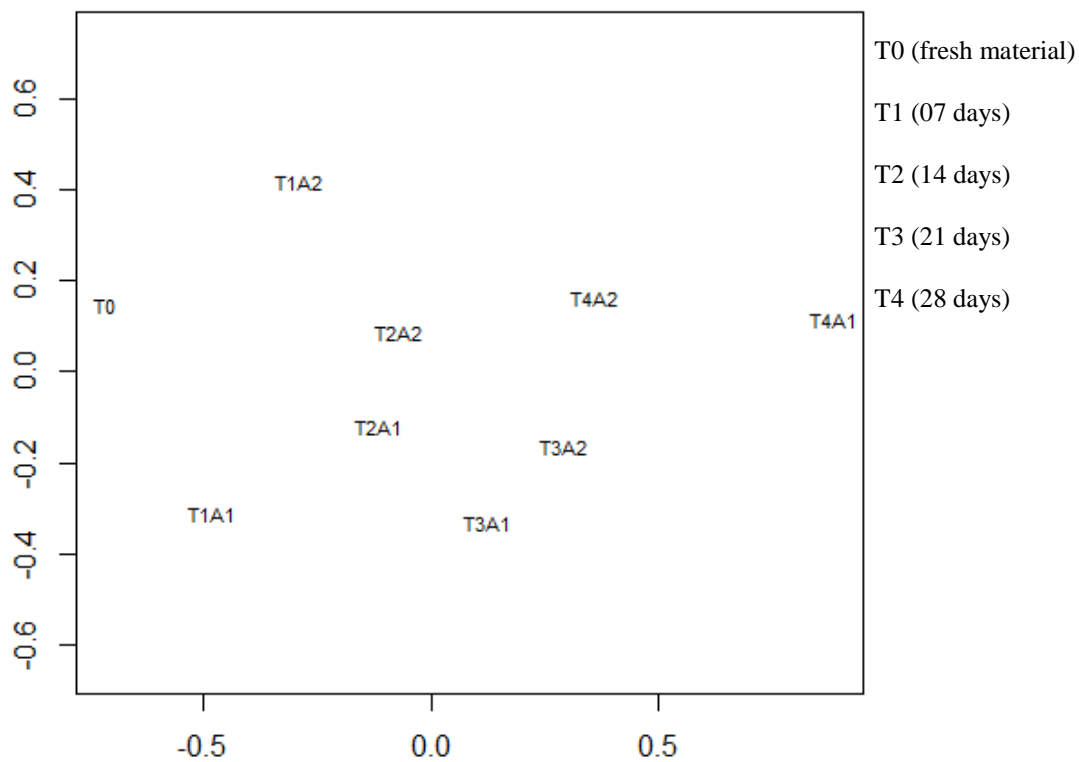


Fig. 1 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of saprobic fungi community on leaf litter of *Clusia nemorosa* at different storage time and temperature. Stress: 0.09

CAPÍTULO II

Saprobic fungi on leaf litter of two trees in the Atlantic Forest, Brazil

Artigo submetido à publicação na revista *Brazilian Journal of Microbiology*

Saprobic fungi on leaf litter of two trees in the Atlantic Forest, Brazil

Loise Araujo Costa¹, Luís Fernando Pascholati Gusmão¹

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Micologia, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44031-460, Feira de Santana, BA, Brazil.

Abstract

The composition and structure of fungal communities associated with leaf litter of *Clusia nemorosa* G. Mey and *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy were investigated. Both are plants belonging to phylogenetically related botanical families and were present in the same environment in a remnant of Atlantic Forest in Bahia, Brazil. The samplings were conducted in June/2011 and January/2013 in Serra da Jibóia during the wet and dry seasons, respectively. The isolation of fungi was determined by method of particle filtration and a total of 1.832 isolated were obtained representing 92 taxa. The wet season has provided the largest number of isolates (1.141) and number of taxa (76) compared to the dry season (641 and 37, respectively). Regarding the plants studied, *C. nemorosa* showed higher species richness and diversity (64 taxa, Simpson=0.95) while the lowest values were represented in *V. guianensis* (59 taxa, Simpson=0.90). The analysis of similarity (ANOSIM) indicated that variations in the composition and community structure between plants and seasons were significant while the nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis showed seasonality as an important factor for the distribution of fungi. However the saprobic fungi communities are dynamic and several factors could be influencing such communities in the Atlantic Forest.

Keywords: fungal communities, seasonality, rainforest, diversity, fungal ecology.

Introduction

The Atlantic Forest has a great diversity of plants, estimating about 20.000 species, including 8.000 endemic (Myers et al., 2000; SOS Mata Atlântica, 2013). This biome is home to one of the largest concentrations of species per square meter on the planet (Thomas et al., 1998). Despite this plants megabiodiversity, the Atlantic Forest suffers major threat, with only 11.7% of its original area remaining, it is considered one of the 34 global hotspots (Ribeiro et al., 2009; Morris, 2010).

As in other forest ecosystems, litter deposited on the soil of the Atlantic Forest is composed of various plant debris of which leaves are the most significant part (Werneck et al., 2001). The fungi, among other microorganisms contribute significantly to decomposition through the ability to degrade a broad spectrum of compounds derived from plants and thus the diversity of leaves in the litter allows the coexistence of various species (Promputtha et al., 2010; Voříšková and Baldrian, 2013). This plurality is due in part to the recurrence of fungal species of certain host plants (Santana et al., 2005; Paulus et al., 2006b; Pasqualatti et al., 2014) and particular stages of decomposition (Cornejo et al., 1994; Yanna et al., 2001; Santhi and Vittal, 2012).

The term recurrence has been suggested by Zhou and Hyde (2001) to replace the *specific* terms and *preference* commonly used to describe interactions of saprobic fungi that occur most often associated with a plant species compared to other species in the same environment. The reasons for the recurrence of fungi on different hosts could involve characteristics of the structure and foliar chemistry (Santana et al., 2005; Paulus et al., 2006b), or the fact that some endophytes, present in the tissues of living leaves, persist in senescence and when they fall on litter, are the first to act in the decomposition (Hyde et al., 2007; Promputtha et al., 2010; Unterseher et al., 2013; Allegrucci et al., 2014). Besides the recurrence of fungi in particular plants, abiotic factors, such as climatic conditions of collection sites and seasonality also influence the composition and structure of communities (Polishook et al., 1996; Ormeño et al., 2006; Paulus et al., 2006b; Allegrucci et al., 2014).

A considerable number of studies have demonstrated the recurrence of saprobic fungi to substrates of decomposing plants and to a greater extent fungi tend to present higher recurrence rate in the host genus level (Polishook et al., 1996; Paulus et al., 2006b;

Kodsueb et al., 2008; Cheewangkoon et al., 2009; Magalhães et al., 2011; Allegrucci et al., 2014). Paulus et al. (2006b) investigated the community of fungi associated to six plants and found low overlap of species. The low overlap observed could be related to the fact that the hosts belong to plants phylogenetically unrelated families. The authors analyzed also the influence of seasonality (wet and dry season) on the distribution of fungi, and taxonomy of the substrate was the most determining factor. Considering the leaf litter of plants species belonging phylogenetically related families no studies have verified if saprobic fungi are recurring to the host or are presented more generalists.

Know if the fungi are recurrent or generalists is important for the estimatives the number of species, particularly in tropical regions (Zhou and Hyde, 2001; Hawksworth, 2001). In this context, the present study aimed to assess the fungi associated with leaf litter of *Clusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae) and *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy (Hypericaceae), plants locally abundant and belonging to phylogenetically related botanical families, during the wet and dry season in a remnant of Atlantic Forest to investigate (1) the composition and structure of the fungal community of both plants that coexist in the same environment; and (2) evaluate the effects of plant species and seasonality in the community diversity.

Material and Methods

The Serra da Jibóia is located in South Reconcavo in the state of Bahia (Figure 1), with an area of approximately 225 km² and altitude ranging between 750-840 m above sea level. The mean annual temperature and rainfall are of 21°C and 1.200 mm, respectively, and the rainfall is concentrated between the months of April to July (Neves, 2005; Tomasoni MA, unpublished data). The remaining months are characterized by low levels of precipitation, less than 100 mm, and thus are called dry months. In order to evaluate the influence of seasonality on the community of fungi were carried out in each area two samplings: one during the wet season and the other during the dry season (considering the average rainfall of three months previous collection, respectively: 114.5 mm and 53.16mm).

Expeditions were conducted in Morro da Pioneira, in the municipality of Santa Teresinha (12°51'S and 39°28'W), in June/2011, during the wet season, and January/2013

during the dry season. Both sampled plants are shrubs presenting up, approximately, three meters in height. Three individual samples of *C. nemorosa* (C1: S 12° 51' 19" and W 39° 28' 32"; C2: S 12° 51' 21" and W 39° 28' 31"; C3: S 12° 51' 18" and W 39° 28' 32") and *V. guianensis* (V1: S 12° 50' 57,3" and W 39° 28' 33,0"; V2: S 12° 50' 53,8" and W 39° 28' 31,4"; V3: S 12° 50' 51,7" and W 39° 28' 30") were chosen in populations, taking into account the presence and amount of litter available at its base. These were marked for subsequent collection. Ten leaves of each individual, called one sample, were collected in each expedition, totaling 60 leaves of each plant species (30 in the wet season, and another 30 in the dry season) which were processed in a maximum of 24 hours. A sample of *C. nemorosa* dry (C3d) was lost due to contamination and not considered in the analysis.

The leaves were first washed with running water and then subjected to a process for surface disinfection according to Paulus et al. (2003a). As a result of the leaves of the two species exhibiting different sizes (larger leaves - *C. nemorosa*; smaller leaves - *V. guianensis*), a standardization of the leaf area was performed after the surface disinfection. The leaves of *C. nemorosa* were subdivided into five areas, and were removed by drawing a fragment equivalent the leaf area of *V. guianensis* (18 cm²). Then the technique of particle filtration for the isolation of fungi described by Bills and Polishook (1994) was applied with adaptations.

Each sample was homogenized for 1 min in 100 mL of sterile distilled water in a blender. The particulate material was washed with distilled water and filtered jets in a group of five stainless steel meshes with decreasing mesh openings (1.0, 0.7, 0.5, 0:25 and 0:18 mm). The particles retained on the mesh of the smaller opening were transferred to centrifuge tubes and suspended in sterile distilled water (up to volume 50 mL), then were vortexed for 1 min and allowed to decant. The supernatant was discarded and the tube was filled with sterile distilled water to a volume of 50 mL. This procedure was performed four times and the residual material was suspended in 20 mL of sterile distilled water. Aliquots (50µL) of the suspension were transferred and inoculated with the aid of a Drigalsky stirring rod in triplicate in Petri dishes of 90 mm diameter, containing dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC - without the addition of dichloran) and malt yeast extract agar (MYE) supplemented with rose bengal (25 mg/L) and chloramphenicol (100 mg/L) (Paulus et al., 2003a).

The plates were incubated under room temperature and light. The mycelial growth of the fungi was observed daily from day two to day 30 of incubation, and after

verification of hyphal growth in the particles, they were transferred to Petri dishes of 60 mm diameter culture medium containing corn meal carrot agar (Castañeda-Ruiz, personal communication), plus fragments of sterilized banana leaves (3 cm²) to induce sporulation (Paulus et al., 2003b).

Pure cultures were examined under a stereomicroscope and revised periodically until the detection of reproductive structures. These were transferred with the aid of a fine needle for slides with mounting means: PVL resin (polyvinyl alcohol lactic + alcohol + phenol) (Trappe & Schenk 1982) and lactic acid. Identification of fungi was performed by morphological measurements and comparison of the structures of taxonomic importance with data present in basic and specific literature.

Isolates that did not sporulate were subsequently cultured in water agar (WA) and oatmeal agar (OA) with fragments of sterilized banana leaves. Sterile mycelia were grouped into morphotypes based on their macroscopic characteristics such as growth rate, margin shape, surface staining and reverse, lift and texture of the mycelium and pigment production in the culture medium (Lacap et al., 2003). Isolates of each species identified were preserved under mineral oil (Buell and Weston, 1947) and Castellani (1967) and deposited at the Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), Universidade Estadual de Feira de Santana.

The diversity of the communities of saprobic fungi of both plant species was evaluated by Simpson's diversity index (Magurran, 1988). The number of taxa expected in the communities was calculated with Chao1 estimator (Chao, 1984).

The difference in richness of fungi of *C. nemorosa* and *V. guianensis* were observed by rarefaction curves (Magurran, 1988). Similarities in species composition between the leaf litter were verified by the ordering of the data performed using the NMDS method (Nonmetric Multidimensional Scaling) (Kruskal, 1964) from the Bray-Curtis dissimilarity matrix. The permutation test ANOSIM (Analysis of Similarity one way) was used to assess differences/dissimilarity between groups of samples (Clarke, 1993). To identify the most influential species and that best contributed to the dissimilarity between groups, the SIMPER analysis (Similarity Percentages) was performed (Clarke, 1993).

The analyzes were conducted in the Biodiversity Pro 2 (Mc Alece, 1997), PAST v. 3.01 (Hammer et al., 2013) and R 3.0.1 (R Core Team, 2013).

Results

A total of 1.832 fungi were isolated from leaf litter of *C. nemorosa* and *V. guianensis* comprising 92 taxa. The greatest number of fungi (1.141) and richness of taxa (76) was observed during the wet season compared to dry season (Table 1). The Simpson diversity index (1-D) for communities of fungi reached values of 0.90 in *V. guianensis*, to 0.95 in *C. nemorosa* and the confidence intervals indicated that the difference between the indexes, although small, is statistically significant since there was no overlap between the values. Considering the same sampling effort, estimated richness obtained by Chao1 for *C. nemorosa* was 70 taxa and *V. guianensis* was 66 taxa (Table 1).

In *C. nemorosa* was isolated fewer number of fungi (869) with the highest richness of taxa (64). The leaves of *C. nemorosa* during the wet season had more taxa while in the dry season the leaves of *V. guianensis* showed greater richness of species (Table 1 and Figure 2). Rarefaction curves showed no stability, however the curves of the samples collected during the dry season showed lower inclination (Figure 2). Given the smaller sample, 291 isolates, to perform a random resampling, the expected richness displayed by the rarefaction curves were 45, 38, 28 and 20 for samples Cw, Vw, Vd and Cd, respectively (Figure 2). However, the differences observed between Cw and Vw were not significant since there was overlap between the confidence intervals (Cw: 41-49; Vw: 34-42).

Among the sporulating isolates, 68 taxa were asexual (13 coelomycetes and 55 hyphomycetes) and nine produced sexual structures in culture. Four ascomycetes formed connections with their asexual forms: *Calonectria gracilipes/Cylindrocladium graciloideum*, *Glomerella cingulata/Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia* sp./*Phyllosticta* sp. and *Pseudomassaria carolinensis/Beltraniella portoricensis*. Taxa *Pestalotiopsis* spp. (14.2%), *P. carolinensis* (12.5%), *Chaetosphaeria* sp. (6.6%), *G. cingulata* (6.6%), *Beltrania rhombica* (6.3%), sterile mycelium sp.7 (6.1%), *Penicillium minioluteum* (3.7%) and *Phomopsis* sp.2 (3.2%) were the most abundant and common in both substrates (Table 2).

Clusia nemorosa showed 33 unique taxa and *V. guianensis* yielded 28 taxa. Thirty two taxa were shared between the two plants, resulting in an overlap of 35% while the percentage of non-overlapping (complementary) was 65%. Among shared taxa between *C.*

nemorosa and *V. guianensis*, *B. rhombica*, *Chaetosphaeria* sp, *G. cingulata*, sterile mycelium sp.7, *P. carolinensis*, *P. minioluteum*, *Pestalotiopsis* spp. and *Phomopsis* sp.2 were the most abundant. Some of these fungi, such as *B. rhombica*, *P. minioluteum* and *Phomopsis* sp.2 were isolated with the same frequency, while others like *Chaetosphaeria* sp., *G. cingulata*, sterile mycelium sp.6 and *P. carolinensis* were more frequent in one of the two kinds of leaves. Some fungi were unique, such as *Gliocladiopsis* sp., *Phomopsis* sp.4 and *Dactylaria belliana* in *C. nemorosa*; and *Satchmopsis brasiliensis*, *Beltraniella* cf. *botryospora* and sterile mycelium sp.13 in *V. guianensis*.

The ANOSIM indicated that there were significant differences in community composition of fungi between leaves of *C. nemorosa* and *V. guianensis* and between seasons ($R=0.8$, $P=0.0004$). The NMDS have displayed a strong tendency of separation between the wet (right) and dry (left) seasons samples as well as between *C. nemorosa* (top) and *V. guianensis* (lower) (Figure 3).

The SIMPER analysis indicated a greater dissimilarity between communities of *C. nemorosa* of wet and dry seasons and the taxa that contributed most to this dissimilarity were *Pestalotiopsis* spp. and sterile mycelium sp.7. The lowest dissimilarity was observed between the communities of *C. nemorosa* and *V. guianensis* in the wet season and the taxon *Pestalotiopsis* spp. had an important contribution to the dissimilarity (Table 3).

Discussion

Using the technique of particle filtering a large number of fungi has been isolated. This approach favors the isolation of fungi with slow growth by reducing the plant substrate to particles a few micrometers long, which theoretically will have a fungus per particle, thereby decreasing competition between fungi and increasing the contact surface of the substrate with the culture medium (Kirby et al., 1990; Bills and Polishook, 1994).

The leaves of *C. nemorosa* showed greater richness, even with a lower number of samples analyzed (05 samples), relative to *V. guianensis* (06 samples). The characteristics of both leaves are distinct and leaves of *C. nemorosa* are thicker leaves when compared to *V. guianensis* which are thinner and brittle. Positive correlation between the richness of fungi and leaf thickness, was demonstrated by Paulus et al. (2006b), where the authors found a greater number of species of fungi associated with leaves of *Cryptocarya*

mackinnoniana presenting greater leaf thickness compared to the other leaves analyzed. This correlation could be related to the higher volume of available substrate for mycelial growth. Other features that were not evaluated in the present study such as area and foliar chemistry, contribute alone or together, for the growth of fungi in leaf litter (Santana et al., 2005; Paulus et al., 2006b).

Regarding seasons, the wet season had more taxa compared to the dry season (76 and 37 respectively). Comparing the communities of fungi by climate season, it appears that *C. nemorosa* showed a greater richness in the wet season (54), while in *V. guianensis* richness was greater during the dry season (31). Precipitation is considered a key environmental factor for the spread of fungi and the decomposition process (Cannon and Sutton, 2004), under conditions of high humidity, the decaying plant debris are more densely colonized by fungi (Paulus et al., 2006b), especially the leaves representing the most significant part of the litter and, therefore, there is a greater biomass and nutrients compared to other plant substrates (Voříšková and Baldrian, 2013).

Rarefaction curves did not reach a level of stability due to the large number of fungi detected and isolated by the method. It can be observed that for the samples of the dry season, the rarefaction curve showed a lower slope, demonstrating that the collection effort was satisfactory. However, when we look at the results of the wet season, it appears that new collections could increase taxa. Taking into consideration the data gathered, regardless of the plant species, the community in the wet season tend to be always greater in number of isolates and species richness compared to the dry season (Figure 2). Considering the overall community of fungi, the richness estimated by Chao1 approached the number of taxa observed, indicating that sampling and methodology of isolating fungi used were efficient.

Regarding the percentages of similarity and complementarity obtained in this study, Polishook et al. (1996) observed similar levels (26-32% and 68-74% respectively) among the communities of saprobic fungi of *Manilkara bidentata* and *Guarea guidoni* in tropical rainforest in Puerto Rico. Santana et al. (2005) found distinct communities among five plant species, with a complementary level of 68%, considering the 10 most frequent fungi. Monkai et al. (2013) found very low levels of similarity between the communities of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners*, reaching values of 1.92 to 8.51%, considering species and genus, respectively. Investigating fungi of 17 tree species in Mediterranean areas, Pasqualetti et al. (2014) observed communities with variable overlaps of species (6-

47%). However, when the community of fungi is investigated in species of the same genus the similarity between them is greater, as observed by Barbosa et al. (2009) between *Clusia nemorosa* and *Clusia melchiorii* (60%).

This pattern has been commonly observed in the studies, in which some fungi are generalists while others are restricted to one plant species, indicating a level of recurrence in the colonization of decaying plant debris (Parungao et al., 2002; Rambelli et al., 2004; Santana et al., 2005; Paulus et al., 2006b; Hyde et al., 2007; Monkai et al., 2013). The leaf litter of different species can differ significantly in their constituents such as lignin, cellulose and secondary compounds, as well as other components. Some of these compounds could be inhibitory to the growth of fungi, whereas others require a variety of enzymes for their degradation (Voříšková and Baldrian, 2013). These differences in the components of the leaves could contribute to differences in the composition and frequency of fungi that have been consistently reported among plant species in temperate (Ormeño et al., 2006; Allegrucci et al., 2014; Pasqualetti et al., 2014) and tropical forests (Paulus et al., 2003a; Rambelli et al., 2004; Paulus et al., 2006b; Magalhães et al., 2011; Monkay et al., 2013).

The spatial and temporal heterogeneity of the community is best viewed by NMDS, which presents a tendency of separation between plant species (C and V), and especially between the wet (w) and dry (d) (Fig 3). In the analysis by ANOSIM, it was demonstrated that the composition and richness of fungal communities were statistically different between plant species and seasons and the SIMPER analysis indicated that *Pestalotiopsis* spp., *P. carolinensis* and sterile mycelium sp.7 were the taxa that contributed most to the dissimilarity between communities.

The result of NMDS indicate that seasonality seems to have been an important factor for the distribution of fungi when compared to the plant substrate factor. *Clusia nemorosa* and *V. guianensis* belong to different botanical families, Clusiaceae and Hypericaceae, but they are phylogenetically related (APG III, 2009), and this fact seems to favor the differences/similarities observed in fungal community. A different result was observed by Paulus et al. (2006b) who investigated the distribution of fungi from four phylogenetically unrelated botanical families (Elaeocarpaceae, Lauraceae, Moraceae and Proteaceae) in a rainforest in Australia. The authors observed that the fungi community were more related to plant species than seasonality, for the parameters of richness and community composition, as they showed low values of overlapping species (13-22%).

Allegrucci et al. (2014) obtained the same results investigating the fungi associated with *Scutia buxifolia* and *Celtis tala* in a xeric forest in Argentina.

This study indicated that the leaf litter in Atlantic Forest contains a large number of fungi, allowing the coexistence of various species. The fungal community was composed of common taxa to both types of plants and confined taxa to one plant or another. Although the highest differences in the communities were observed between the wet and dry seasons, since there was a considerable number of shared fungi between the two plants, probably because belong to phylogenetically related botanical families, the saprobic fungi communities are dynamic and the factors that regulate such communities in the Atlantic Forest are complex, involving more than one factor.

Acknowledgements:

The first author thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the award of a PhD scholarship and the "Programa de Pós-graduação em Botânica - PPGBot/UEFS". The authors thank the "Programa de Pesquisa em Biodiversidade - PPBio Semiárido" for financial support; and colleagues Carolina Azevedo, Josiane Monteiro, Lara Almeida and Tasciano Santa Izabel for technical assistance.

References

- Allegrucci N, Bucsinszkya, AM, Arturib, M, Cabello, MN (2014) Communities of anamorphic fungi on green leaves and leaf litter of native forests of *Scutia buxifolia* and *Celtis tala*: Composition, diversity, seasonality and substrate specificity. Rev Iberoam Micol. doi 10.1016/j.riam.2013.11.002.
- Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J Linn Soc 161:105-121.

- Barbosa FR, Maia LC, Gusmão LFP (2009) Fungos conidiais associados ao folhedo de *Clusia melchiorii* Gleason e *C. nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) em fragmento de Mata Atlântica, BA, Brasil. *Acta Bot Bras* 23(1):79-84.
- Bills GF, Polishook JD (1994) Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycol* 86: 187-198.
- Buell CB, Weston WH (1947) Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections fungus cultures. *Am J Bot* 34: 555-561.
- Cannon PF, Sutton BC (2004) Microfungi on wood and plant debris. *In*: Foster, M.S., Bills, G.F., Mueller, G.M. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier, Amsterdam, 217-239.
- Castellani A (1967) Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. *J Trop Med Hyg* 70: 181-184.
- Chao A (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Sta* 11: 265-270.
- Cheewangkoon R, Groenewald JZ, Summerell BA, Hyde KD, To-anun C, Crous PW (2009) Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. *Persoonia* 23: 55–85.
- Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust J Ecol* 18: 117-143.
- Cornejo FH, Varela A, Wright J (1994). Tropical forest litter decomposition under seasonal drought: nutrient release, fungi and bacteria. *Oikos* 70: 183-190.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2013) *Paleontological statistics*, 1.34 v. Available at: <http://www.folk.uio.no/ohammer/past>. Accessed 09 May 2014.
- Hyde KD, Bussaban B, Paulus B, Crous PW, Lee S, Mckenzie EHC, Photita W, Lumyong S (2007) Diversity of saprobic microfungi. *Biodivers Conserv* 16:7-35.
- Kirby JJH, Webster J, Baker JH (1990) A particle plating method for analysis of fungal community composition and structure. *Mycol Res* 94(5): 621-626.
- Kodsueb R, Mckenzie EHC, Lumyong S, Hyde KD (2008) Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. *Fungal Divers* 30: 37-53.
- Kruskall JB (1964) Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychom* 29: 115-129.

- Lacap DC, Hyde KD, Liew ECY (2003) An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers* 12: 53-66.
- Magalhães DMA, Luz EDMN, Magalhães AF, Filho LPS, Loguercio LL, Bezerra JL (2011) Riqueza de fungos anamorfos na serapilheira de *Manilkara máxima*, *Parinari alvimii* e *Harleyodendron unifoliolatum* na Mata Atlântica do Sul da Bahia. *Acta Bot Bras* 25(4): 899-907.
- Magurran AE (1988) *Ecological diversity and its measurement*, Princeton, New Jersey.
- Martin JP (1950) Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci* 69: 215-232.
- McAleece N (1997) *Biodiversity Profesional Beta I*. The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science, London.
- Monkai J, Promputtha I, Kodsueb R, Chukeatirote E, McKenzie EHC, Hyde KD (2013) Fungi on decaying leaves of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* show litter fungi to be hyperdiverse. *Mycosphere* 4(2): 292–301.
- Morris RJ (2010) Anthropogenic impacts on tropical forest biodiversity: a network structure and ecosystem functioning perspective. *Philos Trans R Soc, Series B* 365: 3709-3718.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nat* 403: 853-845.
- Neves MLC (2005) *Caracterização da vegetação de um trecho de Mata Atlântica de Encosta na Serra da Jibóia, Bahia, Bahia, Brazil*. (M.Sc. Dissertation, Departamento de Ciências Biológicas. UEFS).
- Ormeño E, Baldy V, Ballini C, Larcheveque M, Perissol C, Fernandez C (2006) Effects of environmental factors and leaf chemistry on leaf litter colonization by fungi in a Mediterranean shrubland. *Pedobiol* 50: 1-10.
- Pasqualetti M, Mulas B, Rambelli A, Tempesta S (2014) Saprotrophic litter fungi in a Mediterranean ecosystem: Behaviour on different substrata. *Plant Biosyst* 148(2): 342-356.

- Paulus BC, Gadek P, Hyde K (2003a) Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. *Mycol Res* 107: 748-756.
- Paulus BC, Gadek P, Hyde KD (2003b) Two new species of *Dactylaria* (anamorphic fungi) from Australian rainforests and an update of species in *Dactylaria* sensu lato. *Fungal Divers* 14: 143-156.
- Paulus BC, Gadek PA, Hyde KD (2006a) Successional Patterns of microfungi in fallen leaves of *Ficus pleurocarpa* (Moraceae) in an Australian tropical rain forest. *Biotropica* 38(1): 42-51.
- Paulus BC, Kanowski J, Gadek PA, Hyde KD (2006b) Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycol Res* 110: 1441-1454.
- Parungao MM, Fryar SC, Hyde KD (2002) Diversity of fungi on rainforest litter in north Queensland, Australia. *Biodiv Conserv* 11: 1185-1194.
- Polishook JD, Bills GF, Lodge DJ (1996) Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. *J Industrial Microbiol* 17: 284-294.
- Promptutha I, Hyde KD, McKenzie EHC, Peberdy JF, Lumyong S (2010) Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Divers* 41: 89-99.
- Rambelli A, Mulas B, Pasqualetti M, 2004. Comparative studies on microfungi in tropical ecosystems in Ivory Coast forest litter: behaviour on different substrata. *Mycol Res* 108(3): 325-36.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org>. Accessed 20 February 2014.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142:1141-1153.
- Santana MS, Lodge DJ, Lebow P (2005). Relationship of host recurrence in fungi to rates of tropical leaf decomposition. *Pedobiol* 49: 549-564.

- Shanthi S, Vittal BPR (2012) Fungal diversity and the pattern of fungal colonization of *Anacardium occidentale* leaf litter. *Mycol* 3(2): 132-146.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SOS Mata Atlântica, 2013. Mata Atlântica. Available at: <http://www.sosmatatlantica.org.br>. Accessed 20 May 2014.
- Thomas WWW, Carvalho AMV, Amorim AMA, Garrison J, Arbeláez AL (1998) Plant endemism in two forest in Southern Bahia, Brazil. *Biodiv Conserv* 7: 311-322.
- Unterseher M, Peršoh D, Schnittler M (2013) Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. *Fungal Divers* 60: 43-54.
- Unterseher M, Schnittler M (2009) Dilution to extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.)- different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycol Res* 113: 645-654.
- Voříšková J, Baldrian P (2013) Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J* 7(3): 477-486.
- Yanna, Ho WH, Hyde KD (2001) Fungal communities on decaying palm fronds in Australia, Brunei and Hong Kong. *Mycol Res* 105(12): 1458-1471.
- Wang H, Hyde KD, Soyong K, Lin F (2008) Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. *J Zhejiang Univ Sci* 9(10): 835-841.
- Werneck MS, Pedralli G, Gieseke LF (2001) Produção de serapilheira em três trechos de floresta semidecídua com diferentes graus de perturbações na Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. *Rev Bras Bot* 24(2): 195-198.
- Zhou D, Hyde KD (2001) Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycol Res* 105(12): 1449-1457.

Tables and figures

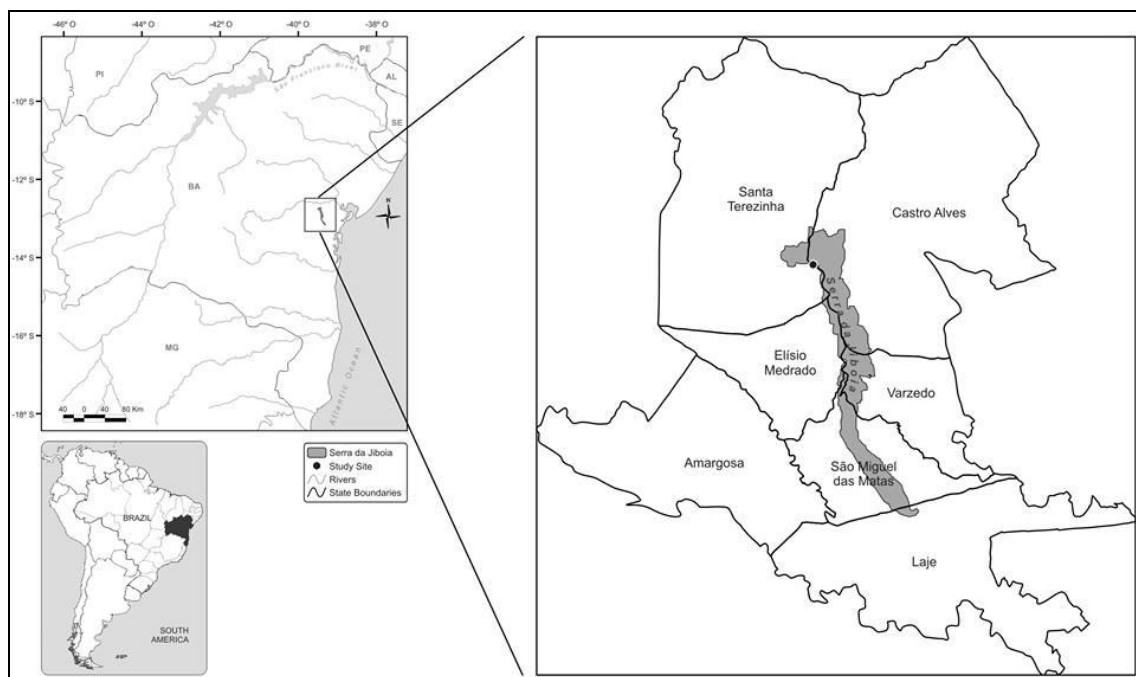


Figure 1 – Location of the Serra da Jibóia in the state of Bahia, Brazil; and collection site indicated by the black point on the map.

Table 1 – Richness, number of fungi, Simpson’s diversity and Chao1 of the fungal communities from leaves of *Clusia nemorosa* and *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia state, Brazil

Substrates	Isolates		Total	Richness		Total	Simpson ^a	Chao1 ^{a,b}
	w	d		w	d			
<i>C. nemorosa</i>	578	291	869	54	20	64	0.95 (0.94-0.95)	70 (65-88)
<i>V. guianensis</i>	563	400	963	45	31	59	0.90 (0.89-0.91)	66 (57-101)
Total	1.141	691	1.832	76	37	92	0.94 (0.93-0.94)	98 (94-114)

a Numbers in brackets refer to 95% confidence intervals.

b Estimating richness for sampling 05 plants of *C. nemorosa* and *V. guianensis*.

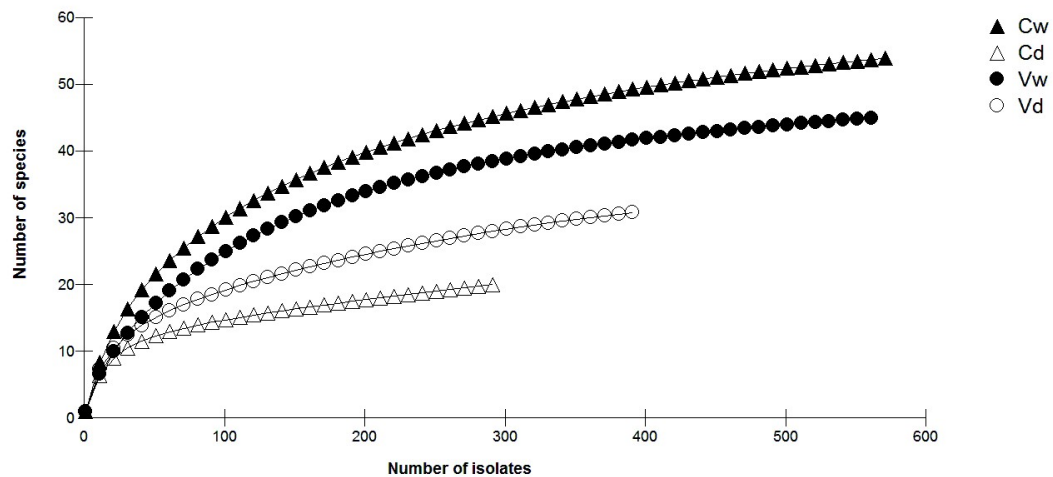


Fig 2 - Rarefaction curves of fungi isolated from leaves of *Clusia nemorosa* (C) and *Vismia guianensis* (V) during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia state, Brazil.

Table 2 - Number of fungi associated with leaf litter of *Clusia nemorosa* and *Vismia guianensis* collected during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia state, Brazil

Taxa	<i>C. nemorosa</i>		<i>V. guianensis</i>		Total
	w	d	w	D	
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	86	0	174	0	260
<i>Pseudomassaria carolinensis</i> M.E. Barr & Hodges	62	1	100	67	230
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	24	1	65	31	121
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	36	0	25	60	121
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.	52	0	18	46	116
Sterile mycelium sp.6	5	91	14	2	112
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx	0	31	0	37	68
<i>Phomopsis</i> sp.2	4	31	3	20	58
<i>Gliocladiopsis</i> sp.	49	0	0	0	49
<i>Phomopsis</i> sp.4	22	24	0	0	46
<i>Dactylaria belliana</i> B.C. Paulus, Gadek & K.D. Hyde	41	0	0	0	41
<i>Satchmopsis brasiliensis</i> B. Sutton & Hodges	0	0	2	38	40
<i>Guignardia</i> sp.	0	28	0	7	35
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	16	0	18	0	34
Sterile mycelium sp.7	2	10	6	14	32
<i>Phomopsis</i> sp.1	0	18	5	8	31
Rare taxa ^a	179	56	133	70	438
Total	578	291	563	400	1 832

a Fungal isolates in a frequency of less than 1.5%: *Acremonium* spp.1 and 2, *Ardhachandra cristaspora*, ascomycetes spp.1-5, *Aspergillus ochraceus*, *Atrosetaphiale fragelliformis*, *Bartalinia* cf. *robillardoides*, *Beltraniella* cf. *botryospora*, *Calonectria gracilipes*, coelomycetes sp., cf. *Chaetosphaeronema* sp.1, *Chalara alabamensis*, *Chalara* cf. *paramontellica*, *Cladosporium-like* sp.1, *Coleophoma* sp., *Cryptophialoidea fasciculata*, *Curvularia geniculata*, *Cylindrocladium candelabrum*, *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocladium gracile*, *Cylindrocladium pauciramosum*, *Dactylaria* cf. *acerosa*, *Dactylaria* cf. *biseptata*, *Dictyochaeta simplex*, *Dinemasporium* sp., *Fusarium lateritium*, *Fusarium solani*, *Gyrotrix* cf. *pediculata*, hifomiceto sp.1-3, *Idriella* cf. *cubensis*, *Idriella lunata*, *Idriella ramosa*, *Idriella* cf. *variabilis*, *Idriella* spp.1 and 2, *Lasiodiplodia theobromae*, *Menisporopsis theobromae*, *Metarhizium anisopliae*, sterile mycelia spp. 1-5 and 8-14, *Ochroconis variabilis*, *Ochroconis* spp.1 and 2, *Paliphora intermedia*, *Parasymphodiella laxa*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium minioluteum*, *Phomopsis* sp.3, *Pyrenochaeta* sp., *Sclerostagonospora* sp., *Scolecobasidiella* cf. *tropicalis*, *Speiropsis scopiformis*, *Stachybotrys chartarum*, *Subulispora longirostrata*, *Thozetella cristata*, *Thozetella gigantea*, *Vermiculiariopsiella immersa*, *Verticillium* sp., *Volutella minima*, *Wiesneriomyces laurinus*, *Zygosporium mansonii*.

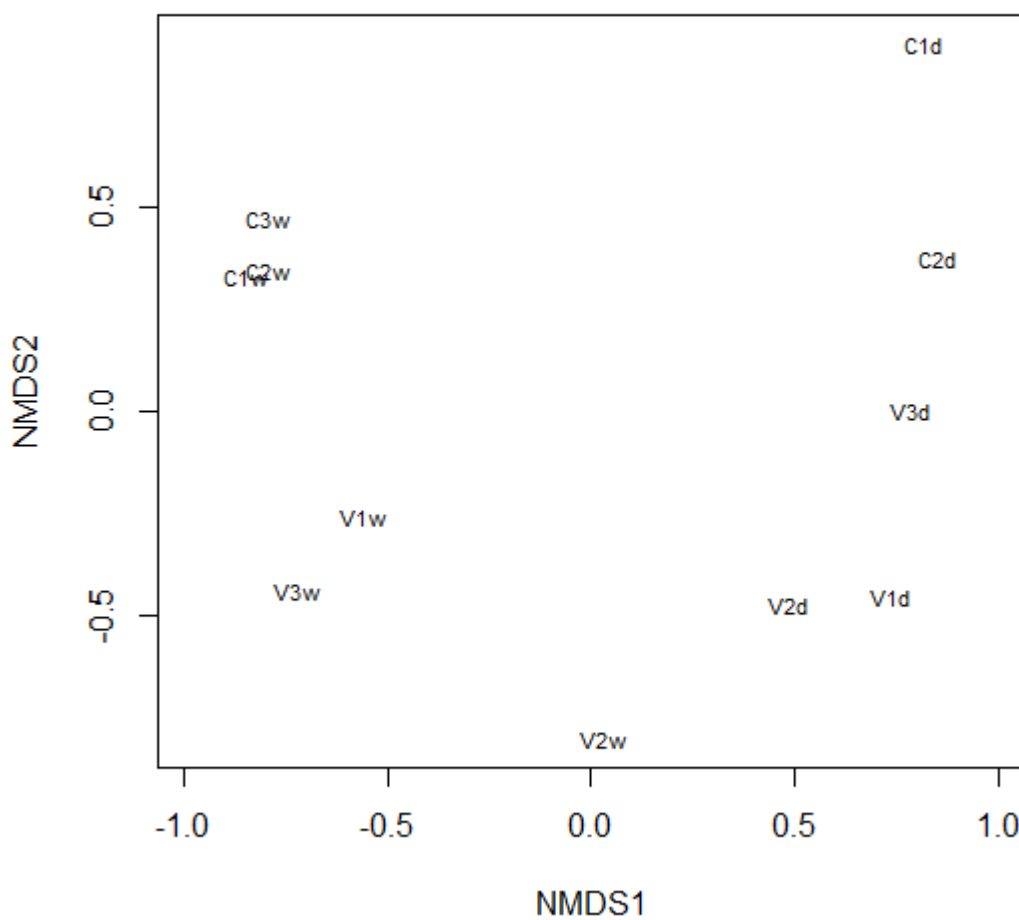


Figure 3 - Ordering in two dimensions by NMDS communities of fungi associated with leaf litter of *Clusia nemorosa* (C) and *Vismia guianensis* (V) during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia state, Brazil. Stress = 0.06.

Table 3 - Analysis of similarity percentage (SIMPER) of fungal communities isolated from *Clusia nemorosa* (C) and *Vismia guianensis* (V) during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia, Bahia state, Brazil

Samples	Average dissimilarity (SIMPER in %)	Promoting species dissimilarity	Contribution (%)
Cw x Cd	91	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	10.87
		Sterile mycelium sp.6	10.87
		<i>P. carolinensis</i>	7.7
Cw x Vw	50.4	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	15.3
		<i>Gliocladiopsis</i> sp.	8.5
		<i>D. belliana</i>	7.1
Cw x Vd	62.1	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	14.1
		<i>Gliocladiopsis</i> sp.	8.1
		<i>D. belliana</i>	6.7
Cd x Vw	90.4	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	22.5
		<i>P. carolinensis</i>	12.8
		Sterile mycelium sp.6	10
Cd x Vd	74.8	Sterile mycelium sp.6	17.2
		<i>P. carolinensis</i>	12.7
		<i>G. cingulata</i>	11.6
Vw x Vd	64.3	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	28.1
		<i>P. minioluteum</i>	6
		<i>S. brasiliensis</i>	5.8

CAPÍTULO III

Communities of saprobic fungi on leaf litter of *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy in remnants of the Brazilian Atlantic Forest

Artigo a ser submetido à publicação na revista Journal of Forestry Research

Communities of saprobic fungi on leaf litter of *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy in remnants of the Brazilian Atlantic Forest.

Loise Araujo Costa¹ and Luís Fernando Pascholati Gusmão¹

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Micologia, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44031-460, Feira de Santana, BA, Brazil.

Abstract

This paper presents a comparative study of mycobiota associated with litter of *V. guianensis* in three Atlantic Forest remnants in the Brazilian semiarid region. In two remnants, the areas studied are made of protected forest reserves while in the third one there exists a major influence of anthropogenic activities on the area studied. The collections were performed in the wet and dry seasons from June 2011 to January 2013. Eighteen samples were processed to isolate fungi using the particle filtration technique and a total of 4.750 species identified in 142 taxa were obtained. A greater number of species was isolated in the wet season. The forest reserves were richer in diversity and were more similar. The multivariate analysis NMDS showed differences in the composition of the communities of fungi in each area and climatic seasons. The analysis of similarity (ANOSIM) showed that the differences were statistically significant ($R=0.85$; $P=0.0001$). These data show that the spatial and temporal heterogeneity, and human activities have significant effects on mycobiota associated with leaf litter of the same plant species.

Key-words: biodiversity, conservation, seasonality, spatial heterogeneity, tropical fungi.

Introduction

The Atlantic Forest is considered one of the richest tropical forests of the world since it possesses a great quantity of species, many of which are endemic (Tabarelli et al. 2010). It is constituted of a mosaic of forest formations and associated ecosystems that originally covered an area of 1.300.000 Km², distributed in an extensional latitudinal amplitude (3-30 S) (SOS Mata Atlântica 2013). Due to the large scale of exploitation, the Atlantic Forest was drastically reduced. Nowadays, 11.7% of the original canopy remains and it is one of the 34 priority areas of conservation in the world. (Mittermeier et al. 2005; Ribeiro et al. 2009).

The paramount levels of endemism produces a distinct biota in the Atlantic Forest and highlights five well-defined centers of endemism, of which four are located in the Northeast (Silva and Casteleti 2003). The Atlantic Forest of the Northeast occupies an area of approximately 19.500 Km² (Tabarelli et al. 2006) and part of the remnants is represented by fragments of rainforest in high areas established in the semiarid region and surrounded by the caatinga, also known as Brejos de Altitude. Around 85% of the Brejos de Altitude were destroyed and only 0.16% (30.05 Km²) of the remaining area (2.626 Km²) pertains to units of conservation (Tabarelli and Santos 2004). Only 9.3% of the residual forests - 157.000 Km² - of the whole biome of the Atlantic Forest are protected natural reserves (Ribeiro et al. 2009).

Several studies have been performed on the diversity of species of plants (Amorim et al. 2005; Nascimento et al. 2012; Tabarelli and Mantovani 1999) and animals (Cetra et al. 2012; Reis et al. 2013) that compose the Atlantic Forest with the purpose of creating strategies for conservation and protection, though, there are few studies and little information on microorganisms present in this site.

The fungi are important components to the functionalism and balance of forest ecosystems by guaranteeing the cycle of carbon and nutrients during the decomposition of organic matter disposing them to plants and promoting the manufacturing of the fertility of the soils (Hättenschwiler et al. 2011). The studies performed in the tropics have demonstrated a high diversity of fungi associated with plants substrates with variable distribution among the species of plants (Paulus et al. 2006; Marques et al. 2008; Hyde et al. 2007; Monkai et al. 2013; Allegrucci et al. 2014). Variations in the community have

also been caused by other factors such as seasonality, with greater diversity usually associated with wet seasons (Kumar et al. 2012; Muthukrishan et al. 2012); and spatial heterogeneity, which is marked by the composition of vegetation and local climate conditions where geographically contiguous areas present more similar communities. (Paulus et al. 2006; Yanna et al. 2001).

The degradation of the habitat is another important factor that have influence on the distribution of fungi in the enviroment. The effects of the anthropogenic intervention on the fungi communities have been shown in diverse groups including the mycorrhizal fungi (Carrenho et al. 2011), soil fungi (Saikia and Joshi 2012) macrofungi decomposers (Brown et al. 2006) and microfungi associated with litter (Allisson et al. 2007). In all studies, a substantial decrease in the richness and abundance of species compared to the associated communities in the preserved areas could be verified. The loss of diversity may have negative implications in the functionality of the ecosystem because species, groups or functional genotypic may become extinct. (Handa et al. 2014).

Considering the importance of knowing the factors that influence the diversity of saprobic fungi in tropical forests, the present study evaluated the aspects of the diversity and the spatial-temporal distribution of mycobiota associated with leaves of *V. guianenensis* (Aubl) Choisy in three remnants of the Atlantic Forest in the semiarid region, during the wet and dry season. In two remnants, the collection areas are constituted of preserved forests, and the third area of study endures a great anthropic influence. We expect to find richness and composition of species similar between the fungal communities from the areas belong to the same biome and present biotic and abiotic characteristics similar; with the community associated to disturbed area having lower richness and diversity in relation to protected areas. In relation to the plant studied, *V. guianensis* is a native species of the tropics specifically of South America and it is broadly distributed in the investigated areas. (Bittrich 2010).

Material and Methods

Areas of study and sampling

The study was done in three remnants of the Atlantic Forest in the semiarid: Morro da Pioneira in the Serra da Jibóia (SJ), in the municipality of Santa Terezinha, Bahia;

Parque Nacional de Ubajara in the Serra da Ibiapaba (SI), in the municipality of Ubajara, Ceará; and the Reserva Ecológica Mata Pau-Ferro in the Brejo Paraibano (BP), in the municipality of Areia, Paraíba (Figure 1). In SI and BP the study areas are protected environmentally and SJ area is altered by intense human activity.

The vegetation in the three areas consists of dense rain forest at higher elevations and scrub occupying the lower levels in the mountainside. Rainfall is high reaching annual average of more than 1.200 mm and the wet and dry seasons are well defined, with the months focusing greater precipitation rates: SJ April to July; SI January to June; and BP from January to August. In relation to altitude, there is a variation between areas ranging from 500-800 m above sea level (SI 800m; BP 500-600m; SJ 500-800m) (Tomasoni and Santos 2003; Tabarelli and Santos 2004; Santos and Souza 2012).

Two expeditions were performed in each area, one in the wet season (w) and the other in the dry season (d) totaling six expeditions in the field from June 2011 to January 2013. Three individuals were selected of *V. guianensis* in each area investigated, taking into consideration the amount of available litter at its base. These were carefully marked for subsequent collection. Ten leaves of each plant were collected in each expedition, totaling 180 leaves, which were processed for isolation of fungi in a period of up to 48 h.

Isolation of fungi

The leaves were washed in fresh water to eliminate impurity on their surface and then were submitted to the superficial disinfection second Paulus et al. (2003a). The isolation of the fungi was done using the protocol of particle filtration described by Bills and Polishook (1994) with some adaptations.

Each sample was homogenized for 1 min in 100 mL of sterile distilled water in a blender. The particulate material was washed with jets of distilled water and was filtered in a set of five stainless steel meshes with decreasing mesh openings (1.0, 0.7, 0.5, 0.25 and 0.18 mm). The retained particles on the mesh of the smaller opening were transferred to centrifuge tubes and suspended in sterile distilled water (up to volume 50 mL), then were vortexed during 1 min and allowed to decant. The supernatant was discarded and the tube was filled with sterile distilled water to a volume of 50 mL. This procedure was done four times and the residual material was suspended in 20 mL of sterile distilled water. Aliquots of 50uL of the suspension were transferred and inoculated with the aid of a Drigalsky

stirring rod in triplicate in Petri dishes of 90 mm diameter, containing dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC, without the addition of dichloran) and malt yeast extract agar (MYE) supplemented with rose bengal (25 mg/L) and chloramphenicol (100 mg/L) (Paulus et al. 2003a).

The plates were incubated under room temperature and light. The mycelial growth of fungi was observed daily from the second day to the thirtieth day of incubation. Once the growth of hyphae in the particles was verified, they were transferred to Petri dishes of 60mm in diameter with corn meal and carrot agar (Castaneda-Ruiz personal communication) added to fragments of sterilized banana leaves (Paulus et al. 2003b).

The isolates that did not sporulated were cultivated in water agar (WA) and oatmeal agar (OA) with fragments of banana tree leaves. The sterile mycelia were grouped in morphotypes based on macroscopic characteristics such as growth rate, type of margin of colony, coloration of the surfaces and reverse, elevation and texture of mycelia and production of pigments in the culture medium (Lacap et al. 2003). Representative isolates of each species were preserved under mineral oil (Buell and Weston 1947) and Castellani (1967) and deposited at the Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB) of the Universidade Estadual de Feira de Santana.

Data analyses

Quantitative and binary data of isolated fungi were utilized in the statistical analyses using the following programs: Biodiversity Pro 2 (Mc Aleece 1997), PAST v. 3.01 (Harmer et al. 2013) and R 3.01 (R Core Team 2013).

The comparison of richness of fungi obtained in SJ, SI and BP during the wet and dry seasons was done by the construction of rarefaction curves (Magurran 1988). The rarefaction method allows an important comparison of the richness of the species among data groups of different sizes. The diversity of the mycobiota in the three areas was evaluated by the Simpson's diversity index (Magurran 1988), represented as the inverse of the dominance ($1/D$) and confidence intervals to 95% were calculated with the bootstrap method (Grünwald et al. 2003). The expected number of taxa for the isolated communities in each area was calculated with the Chao1 estimator (Chao 1987).

Similarities in species composition between areas and seasons were verified by NMDS method (*Nonmetric Multidimensional Saling*) (Kruskal 1964) from the similarity

matrix of Bray-Curtis. The permutation test ANOSIM (*Analysis of Similarity one way*) was used to assess differences/dissimilarities between the sample groups (Clarke 1993), considering 5% of significance. To identify the most influential species that best contributed to the divergence between groups was performed the analysis SIMPER (*Similarity Percentages*) (Clarke 1993).

Results

Among a total of 4.725 specimens, 142 taxa were identified (124 fertile and 18 sterile mycelia) and isolated from the leaf litter of *V. guianensis* (Table 1). BP and SI were the richest, both represented by the same number of taxa (82), and a greater number of isolates (1.957 and 1.805, respectively) while the results in SJ yielded lesser quantities. The Chao1 richness estimator obtained for SJ, SI and BP were 67, 94 and 109 taxa, respectively. SI had the highest diversity using the Simpson index ($1/D = 16.6$) followed by BP ($1/D = 13.8$). The fungal communities obtained during the wet season yielded a higher richness in all areas (SJ = 45, BP = 58, SI = 68) compared to the dry season (Table 1).

Rarefaction curves did not form an asymptote (Figure 2). The curves show that for a standard sample of 400 isolates (the total number of the isolates from smaller samples) the expected number of taxa and the confidence intervals were 28 (27-29), 31 (30-32), 36 (31-42), 41 (38-45), 49 (44-56) and 49 (45-55) for samples Sid, SJd, BPd, SJw, SIw and BPw, respectively (Figure 2).

Thirty taxa (21.1%) were shared between the areas and 91 taxa were unique, and distributed as follows: 37 in BP, SI 35 and 19 in SJ. (Figure 3). BP and SI shared 11 taxa, SI and SJ 06 taxa, and BP and SJ 04 taxa (Figure 3). Considering the total of taxa obtained (142), only 11 had abundance more than 100 specimens (7.7%) and among these *Pseudomassaria carolinensis*, *Pestalotiopsis* spp., ascomycete sp.2, *Glomerella cingulata*, *Beltrania rhombica*, *Beltraniella botryospora*, sterile mycelium sp.2-3 and *Chaetosphaeria* sp. were detected in the three study areas. Taxa represented by few specimens, considering a frequency $\leq 0.5\%$, accounted most in the community (104 taxa) (Table 2). Thirty-six taxa (25.3%) were singletons, represented by only one specimen. Highlighting the presence of

singletons in the communities in each area the numbers decreased to 24, 17 and 12 in BP, SI and SJ, respectively (Table 2).

The fungi were isolated in higher frequency in the asexual stage (hyphomycetes 58.5% + 19.7% coelomycetes = 77.5%), and less frequently in the sexual phase (8.5%). Among the sexual fungi, five formed connections with the asexual stage: *P. carolinensis*/*Beltraniella portoricensis*, *Pseudomassaria* sp./*Beltraniopsis* sp., *G. cingulata*/*Colletotrichum gloeosporioides*, *Calonectria graciloideum*/*Cylindrocladium gracilipis* and *Phyllosticta* sp./*Guignardia* sp. The sterile mycelia were isolated at a frequency of 16.7% (Table 2).

The graph obtained by the NMDS ordination method showed a separation between the fungal communities by area and season (Figure 4). The communities in the areas SI and BP were the most similar to each other in relation to SJ community which presented more distinct. Regarding the wet and dry seasons, the SI_d community was the most dissimilar. The ANOSIM test showed significant differences between the pre-formed groups by NMDS ($R = 0.85$, $P = 0.0001$).

The SIMPER analysis showed greater dissimilarity between communities in the wet and dry seasons in SI, with an average of 83.82% and *Immersidiscosia cf. eucalypti* as the most influential species related to dissimilarity. The comparison between the seasons shows that in BP had the lowest average, 58.1% (Table 3). Taxa that showed a contribution of over 10% to the dissimilarity between groups were ascomycete sp.2, *I.cf. eucalypti*, sterile mycelium sp.1, *P. carolinensis* and *Pestalotiopsis* spp. (Table 3).

Discussion

The richness of fungi associated with leaf litter of *V. guianensis* was considerable since 142 taxa were characterized. The temporal and spatial heterogeneity affected the diversity of the species observed, due to the fact that some taxa are more frequent or exclusive in one of the areas or seasons. Because the rarefaction curves did not reach stability and the differences between observed and expected richness were representative (difference of 35 taxa, considering the total richness), the results indicate that most collections could increase the number of taxa and thus obtain a greater richness of fungi associated with the plant investigated.

Communities in the wet season had a higher species richness when compared to the other season. The number of isolates seems to present the same trend, although in BP the highest numbers were registered in the dry season. Moisture is an essential environmental factor for the survival of fungi that influences different processes in the lifecycle, such as spore germination, infection and colonization of plant substrate, as well as the development of reproductive structures (Cannon and Sutton 2004). In circumstances of low water availability, the decomposition process and the diversity of this mycobiota are affected (Kumar et al. 2012), although some studies have found greater richness and occurrence of fungi during the dry season (Kodsueb et al. 2008; Seephueak et al. 2011).

The species composition between seasons in each area proved to be distinct and SI showed greater dissimilarity, probably due to wide variation in rainfall between collections (rainy season: 113.4 mm; dry season: 0.6 mm, data FUCEME). During the dry season the litter proved to be very dry and brittle compared to the wet season. The low atmospheric humidity in the dry season, possibly affected the populations of fungi and, consequently, the community showed lower richness and number of isolates compared the wet season (Lodge and Cantrell 1995).

The distribution of saprobes fungi species of *V. guianensis* follow a common pattern in which few species are abundant and a large number of species are less common. A group of fungi is common to mycobiota associated with *V. guianensis*, being present in all investigated areas, and consists mainly of cosmopolitan species as *B. rhombica*, *Pestalotiopsis* spp., *P. carolinensis* and *G. cingulata*. Among the most frequent taxa ascomycete sp.2, *I. cf. eucalypti*, sterile mycelium sp.1, *P. carolinensis* and *Pestalotiopsis* spp., had a greater contribution to the separation of communities on the area and season. This result demonstrates the importance of these taxa to the similarity/dissimilarity between mycobiotas. The presence of less abundant taxa could be related to recurrence plant species (Collado et al. 2007) or spatial heterogeneity represented by the variability of substrates that compose the litter, which allows the coexistence of different fungi and the colonization these fungi in different substrates (Voříšková and Baldrian 2013).

The highest similarity observed between areas BP and SI could be related to the geographical location and similarities between the composition of the vegetation. BP and SI are the closest in proximity (~675 km), compared to BP-SJ (~781 km) and SI-SJ (~1.020 km), and both comprise the same center of endemism located north of the São Francisco river while SJ is located in another center and south of the river (Figure 1).

Considering the centers situated in the north of the São Francisco river, the biota presents a greater similarity to each other, yet distinct from other areas of the Mata Atlantica rainforest, because of the strong influence of the Amazon rainforest (Andrade-Lima et al. 1982;. Santos et al. 2007; Tabarelli and Cavalcanti 2004). One hypothesis that explains the exchange between biotas suggests that in the past the Amazon and Atlantic Forest were connected presenting a unique biota that was widely distributed in the region. However, the various periods of isolation has led to fragmentation of the ancestral biota causing current patterns of distribution and differentiation of species present in each of the forests (Andrade-Lima 1982; Santos et al. 2007).

The results obtained by ANOSIM, NMDS and SIMPER indicate that the spatial and temporal heterogeneity have significant effects on the structure and composition of the fungal community even if it is the same plant species investigated in areas of a single biome that share biotic and abiotic characteristics. According to Feinstein and Blackwood (2013) the differences in the composition in the community of fungi related to spacial heterogeneity (to a greater or lesser extent) are due to particular "selective" factors within of each environment for fungal species and the majority of these factors are associated with climate conditions.

The lower species richness in SJ may be related to the effects of anthropogenic impacts on the study area. In the Morro da Pioneira, the sampling location in SJ, the original vegetation in many points, has been destroyed, mostly by illegal logging and burning for agricultural cultivation. Studies have shown that environmental disturbances caused by human activities modify the richness, structure and composition of the fungi community (Allison et al. 2007; Sharma et al. 2011) and these changes affect the decomposition process (Hättenschwiler et al. 2011) because it reduces or extinguish functional species in the community (Santana et al. 2005). The decrease in the decomposition rate results in a deficit between the rates input of substrate in the litter and mineralization of nutrients (Sharma et al. 2011), consequently, causing significant effects on plant growth, composition of vegetation and balance of the ecosystem (Hättenschwiler et al. 2005).

The knowledge of how natural and anthropogenic factors influence in a fungal community can provide subsidies in the search of strategies for the preservation and conservation of threatened endangered ecosystems, such as the Atlantic Forest. The preservation of remnants constituted of conserved relatively forests is of utmost

importance for the maintenance of the diversity of fungi decomposers in this biome (Lodge 1997).

The results of this study indicate that spatial heterogeneity, temporal and anthropogenic activities of degradation have significant effects on the richness, structure and composition of fungal communities associated with leaf litter. The greatest similarities were observed between the communities of two forests reserves, both located in the same center of endemism, while the remainder with more dissimilar composition is in another center of the Atlantic Forest. The lower diversity found in this remnant may be related to the effects of human activities on the area. In these circumstances, species may be lost with unknown functions within the ecosystem functionality. More taxonomic and ecological studies of fungi associated with leaf litter in areas of the Atlantic Forest need to be performed to assist in the policies of protection and management of these environments.

Acknowledgements

The Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the Doctoral scholarship (Program Postgraduate Botany/UEFS), granted to the first author. The authors thank Lucas Abreu and Ludwig Pfenning, Universidade Federal de Lavras, for help in identifying coelomycetes; to Cristina Motta, the URM Culture Collection, for the identification of the genera *Penicillium* and *Aspergillus*; Rafael Ruiz-Castañeda, of the Instituto de Investigaciones en Fundamentales Tropical Agriculture in Cuba, for help in identifying hyphomycetes; and biologists Carolina Azevedo, Carolina Ribeiro, Ithala Santana, Josiane Monteiro, Lara Almeida, Taiana Conceição and Tasciano Santa Izabel-for technical support for this work.

References

- Allison SD, Hanson C A, Treseder KK. 2007. Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biol Biochem*, 39(8): 1878-1887.
- Allegrucci N, Bucsinszkya AM, Arturib M, Cabello MN, 2014. Communities of anamorphic fungi on green leaves and leaf litter of native forests of *Scutia buxifolia*

- and *Celtis tala*: Composition, diversity, seasonality and substrate specificity. *Rev Iberoam Micol*, (doi 10.1016/j.riam.2013.11.002).
- Amorim AM, Jardim JG, Clifton BC, Fiaschi P, Thomas WW, Carvalho AMV. 2005. The vascular plants of a forest fragment in southern Bahia, Brazil. *Sida*, 21: 1727-1752
- Andrade-Lima D. 1982. Present-day forest refuges in Northeastern Brazil. In: GT Prance (ed.) *Biological diversification in the tropics*. New York: Columbia University Press, pp. 245-251.
- Bills GF, Polishook JD. 1994. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycol*, 86: 187-198.
- Bittrich V. 2010. Hypericaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25586>. Acesso em: 26.04.2014.
- Brown N, Shonil B, Watkinson S. 2006. Macrofungal diversity in fragmented and disturbed forests of the Western Ghats of India. *J Appl Ecol*, 43:11–17.
- Buell CB, Weston WH. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections fungus cultures. *Am J Bot*, 34: 555-561.
- Cannon PF, Sutton BC. 2004. Microfungi on wood and plant debris. In: MS Foster, GF Bills, GM Mueller (eds), *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier, pp. 217-239.
- Carrenho R, Gomes-Costa SM. 2011. Environmental degradation impact on an urban fragment of a Subdeciduous plateau forest on native communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Bot Bras*, 25(2):376-379.
- Castellani A. 1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. *J Trop Med Hyg*, 70: 181-184.
- Cetra M, Barrella W, Langeani-Neto F, Martins AG, Mello BJ, Almeida RS. 2012. Fish fauna of headwater streams that cross the Atlantic Forest of south São Paulo state. *Check List*, 8(3): 421-425.
- Chao A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 43(4):783-791.

- Clarke KR. 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust J Ecol*, 18:117-143.
- Collado J, Platas G, Paulus B, Bills G. 2007. High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiol Ecol*, 60:521-533.
- Feinstein LM, Blackwood CB. 2013. The spatial scaling of saprotrophic fungal beta diversity in decomposing leaves. *Mol Ecol*, 22:1171–1184.
- Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Anal Theor Plant Pathol*, 93(6):738-746.
- Handa T, Aerts R, Berendse F. 2014. Consequences of biodiversity loss for litter decomposition across biomes. *Nat*, 509: 218–221.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2013. Paleontological statistics, 1.34 v. Disponible em: <http://www.folk.uio.no/ohammer/past>.
- Hättenschwiler S, Fromin N, Barantal S. 2011. Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. *C. R. Biologies*, 334:393-402.
- Hättenschwiler S, Tiunov AV, Scheu S. 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst*, 36:191-218.
- Hyde KD, Bussaban B, Paulus B, Crous PW, Lee S, Mckenzie EHC, Photita W, Lumyong S. 2007. Diversity of saprobic microfungi. *Biodivers Conserv*, 16:7-35.
- Kodsueb R, Mckenzie EHC, Lumyong S, Hyde KD. 2008. Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. *Fungal Divers*, 30:37-53.
- Kruskall JB. 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, 29:115-129.
- Kumar R, Tapwal A, Baruah DM. 2012. Leaf litter decomposition pattern in *Dipterocarpus tuberculatu* and *Dipterocarpus retusus* forests of North East India. *Res J For*, 6: 24-31.
- Lacap DC, Hyde KD, Liew ECY. 2003. An evaluation of the fungal ‘morphotype’ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers*, 12: 53-66.
- Lodge DJ. 1997. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. *Biodivers Conserv*, 6:681-688.

- Lodge DJ, Cantrell S. 1995. Fungal communities in wet tropical forests: variation on time and space. *Can J Bot*, 73:1391-1398.
- Magurran AE. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton: Princeton University Press, 177 p.
- Marques MFO, Gusmão LFP, Maia LC. 2008. Riqueza de espécies de fungos conidiais em duas áreas de mata atlântica no Morro da Pioneira, Serra da Jibóia, BA, Brasil. *Acta Bot Brasil*, 22: 954-961.
- McAleece N. 1997. Biodiversity Profesional Beta I. London. The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science.
- Mittermeier R, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim JD, Brooks T, Mittermeier CG, Fonseca GAB. 2005. *Hotspots Revisited: Earth's 7 biologically richest and most endangered ecoregions*. Mexico City: CEMEX & Agrupacion Sierra Madre, 640 pp.
- Monkai J, Promputtha I, Kodsueb R, Chukeatirote E, McKenzie EHC, Hyde KD. 2013. Fungi on decaying leaves of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* show litter fungi to be hyperdiverse. *Mycosphere*, 4(2):292–301.
- Muthukrishan S, Sanjayan KP, Jahir HK. 2012. Species composition, seasonal changes and community ordination of alkalotolerant micro fungal diversity in a natural scrub jungle ecosystem of Tamil Nadu, India. *Mycosphere*, 3(2):92-109.
- Nascimento LD, Rodal MJN, Silva AG. 2012. Florística de uma floresta estacional no Planalto da Borborema, nordeste do Brasil. *Rodriguésia*, 63(2): 429-440.
- Paulus BC, Gadek P, Hyde K. 2003a. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. *Mycol Res*, 107: 748-756.
- Paulus BC, Gadek P, Hyde KD. 2003b. Two new species of *Dactylaria* (anamorphic fungi) from Australian rainforests and an update of species in *Dactylaria sensu lato*. *Fungal Divers*, 14: 143-156.
- Paulus BC, Kanowski J, Gadek PA, Hyde KD. 2006. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycol Res* 110: 1441-1454.

- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- Reis PCJ, Rocha WD, Falcão LDA, Guerra TJ, Neves FS. 2013. Ant fauna on *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) trees in an Atlantic Forest area, southeastern Brazil. *Sociobiol*, 60(3):222-228.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv*, 142: 1141-1153.
- Saikia P, Joshi SR. 2012. Changes in Microfungal Community in Cherrapunji - The Wettest Patch on Earth as Influenced by Heavy Rain and Soil Degradation. *Adv Microbiol*, 2(4):456-464.
- Santana MS, Lodge DJ, Lebow P. 2005. Relationship of host recurrence in fungi to rates of tropical leaf decomposition. *Pedobiol*, 49: 549-564.
- Santos AMM, Cavalcanti DR, Silva JMC, Tabarelli M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *J Biogeogr*, 34:437-446.
- Santos FLA, Souza MJN. 2012. Caracterização geoambiental do planalto cuestiforme da Ibiapaba, Ceará. Eixo temático: geomorfologia e cotidiano. *Revta Geonorte*, 2(4):301-309.
- Seephueak P, Phongpaichit S, Hyde KD, Petcharat V. 2011. Diversity of saprobic fungi on decaying branch litter of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mycosphere*, 2(4):307-330.
- Sharma G, Pandey RR, Singh MS. 2011. Microfungi associated with surface soil and decaying leaf litter of *Quercus serrata* in a subtropical natural oak forest and managed plantation in Northeastern India. *Afr J Microbiol Res*, 5(7):777-787.
- Silva JMC, Casteleti CH. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: C Galindo-Leal, IG Câmara (eds.), *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook*. Washington: Island Press, pp. 43-59.
- SOS Mata Atlântica, 2013. Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br>. Acesso em: 20.05.2014.

- Tabarelli M, Aguiar AV, Ribeiro MC, Metzger JP, Peres CA. 2010. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. *Biol Conserv*, 143:2328-2340.
- Tabarelli M, Mantovani W. 1999. A riqueza de espécies arbóreas na floresta Atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). *Revta Brasil Bot*, 22: 217-223.
- Tabarelli M, Melo MDVC, Lira OC. 2006. A Mata Atlântica do Nordeste, In: M Campanili, M Prochnow (eds.), *Mata Atlântica uma rede pela Floresta*. Brasília: Rede de Ongs da Mata Atlântica, pp. 149-164.
- Tabarelli M, Santos AMM. 2004. Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos. In: KC Porto, JJP Cabral, M Tabarelli (eds.), *Brejos de altitudes em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, pp. 17-24.
- Tomasoni MA, Santos SD. 2003. *Lágrimas da Serra: Os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA Municipal da Serra da Jibóia, no município de Elísio Medrado*. Rio de Janeiro: X Simpósio Nacional de Geografia Física Aplicada, Ed. UFRJ, v.1.
- Voříšková J, Baldrian P. 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J*, 7(3): 477-486.
- Yanna, Ho WH, Hyde KD. 2001. Fungal communities on decaying palm fronds in Australia, Brunei and Hong Kong. *Mycol Res*, 105(12):1458-1471.

Tables and Figures

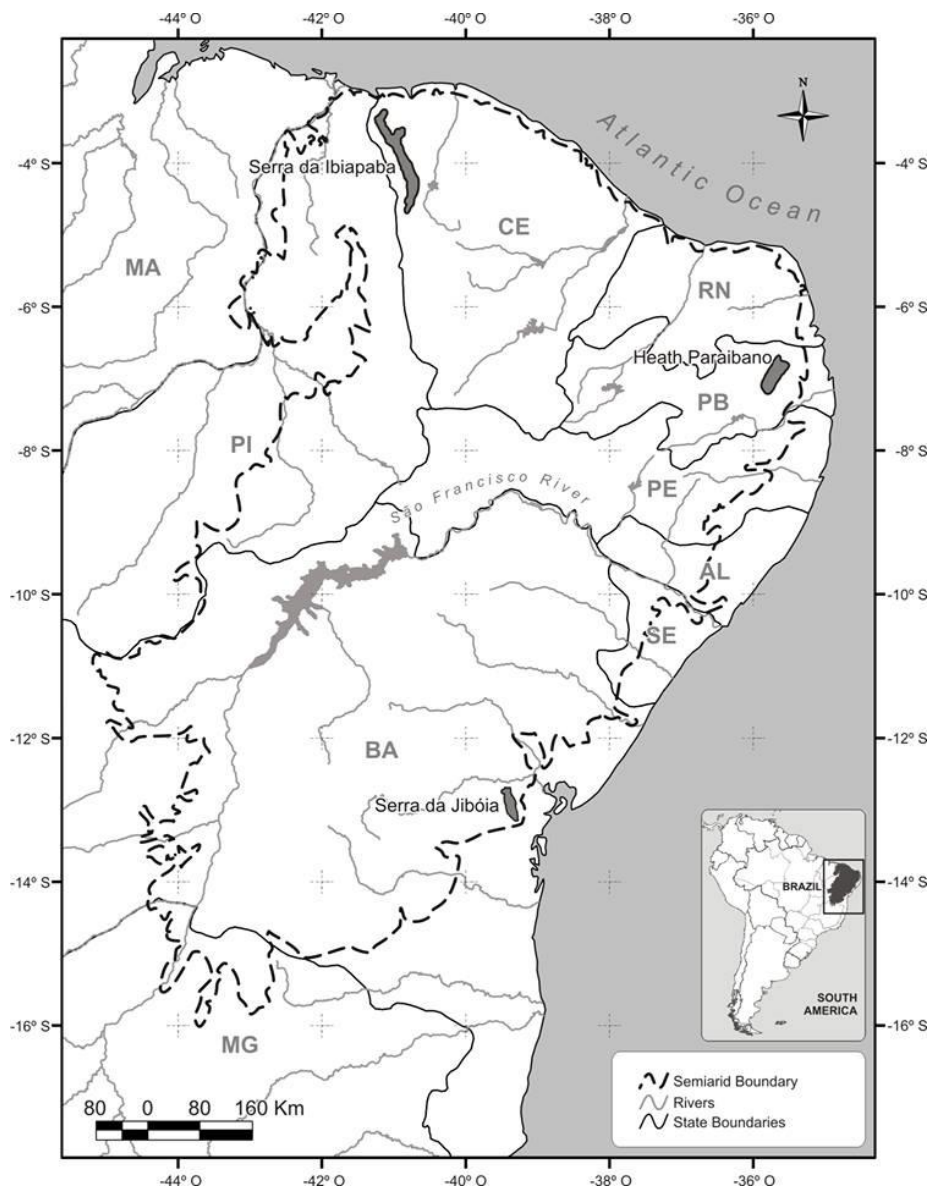


Figure 1. Geographical location of Atlantic Forest remnants investigated in the study: Serra da Ibiapaba (Ceará), Brejo Paraibano (Paraíba) and Serra da Jibóia (Bahia).

Table 1. Number of isolates, richness, Chao1 and Simpson's diversity of the fungal communities from leaves of *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Serra da Jibóia (SJ), Serra da Ibiapaba (SI) and Brejo Paraibano (BP), Brazil

Areas	N° isolates		Total	Richness		Total	Chao1 ^a	(1/D) ^b
	w	d		w	d			
Serra da Jibóia	563	400	963	45	31	59	67(56-79)	11.1
Serra de Ibiapaba	1.382	423	1.805	68	29	82	94(76-107)	16.6
Brejo Paraibano	714	1.243	1.957	58	52	82	109(75-116)	13.8
Total	2.659	2.066	4.725	112	76	142	177(133-182)	22.7

a Numbers in parentheses refer to 95% confidence interval.

b Simpson's diversity index.

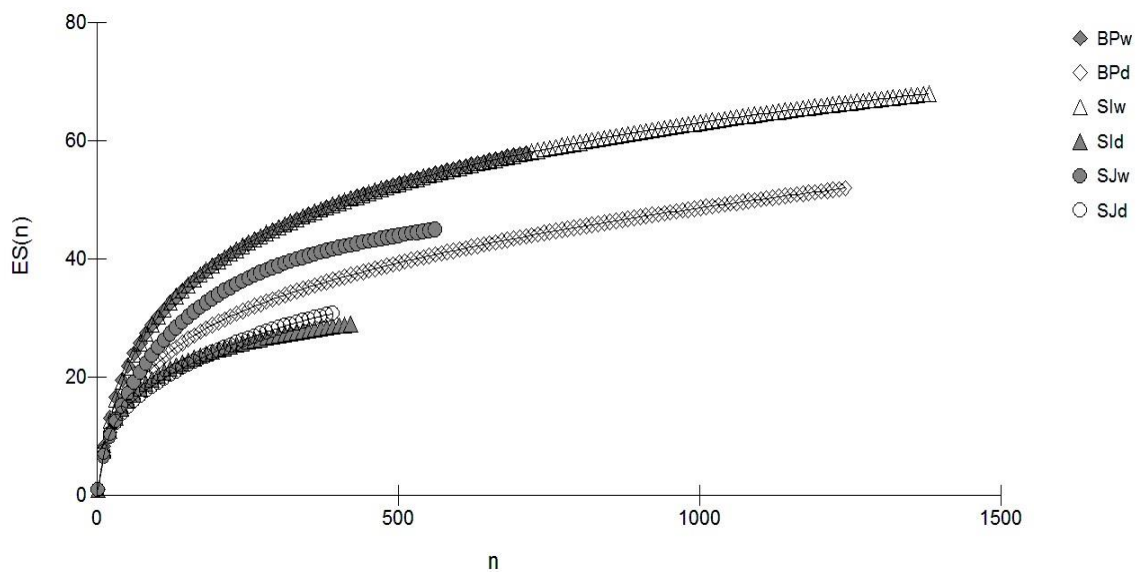


Figure 2. Rarefaction curves of fungi isolates from leaves of *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ). n is the number of isolates and $ES(n)$ is the number of species.

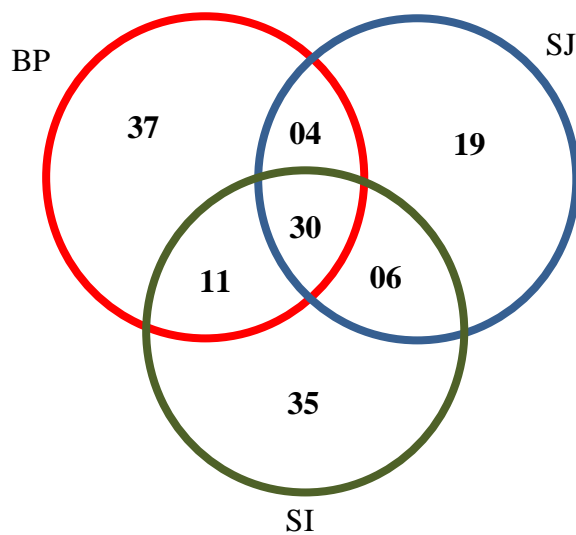


Figure 3. Number of fungi species associated with leaf litter of *Vismia guianensis* unique and common to the areas of study: Serra da Jibóia (SJ), Serra da Ibiapaba (SI) and Brejo Paraibano (BP).

Table 2. Number of fungi associated with leaf litter of *Vismia guianensis* collected during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ)

Fungal taxa	BP		SI		SJ		Total
	w	d	w	d	w	d	
<i>Pseudomassaria carolinensis</i> M.E. Barr & Hodges	132	190	61	0	100	67	550
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	0	158	27	51	174	0	410
<i>Immersidiscosia</i> cf. <i>eucalypti</i> (Pat.) Kaz. Tanaka, Okane & Hosoya	0	0	349	0	0	0	349
ascomycetes sp.2	52	219	0	11	0	2	284
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	36	80	12	53	25	60	266
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.	5	0	110	0	18	40	179
<i>Beltraniella</i> cf. <i>botryospora</i> Shirouzu & Tokum.	62	13	90	0	0	13	178
sterile mycelium sp.1	0	134	0	0	0	20	154
sterile mycelium sp.2	15	97	6	32	0	3	153
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	30	9	9	2	65	31	146
sterile mycelium sp.3	33	36	27	9	3	0	108
<i>Gyrotrix</i> cf. <i>pediculata</i> J.L. Cunn.	13	0	77	0	5	0	95
<i>Pseudorobillarda</i> cf. <i>texana</i> Nag Raj	0	0	41	50	0	0	91
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx	11	0	38	3	0	37	89
<i>Phomopsis</i> sp.2	13	28	17	4	3	20	85
<i>Phomopsis</i> sp.3	43	16	12	2	9	1	83
<i>Idriella</i> sp.2	3	5	62	0	9	2	81
<i>Phomopsis</i> sp.1	17	33	9	8	5	8	80
<i>Thozetella cristata</i> Piroz. & Hodges	20	20	32	0	6	1	79
<i>Dactylaria</i> cf. <i>biseptata</i> Matsush.	16	1	56	0	0	0	73
Other fungi ^a	213	204	347	198	141	89	1192

^a Fungi isolated in a lower rate of 1.5%: *Acremonium* sp.1, ascomycetes spp.1, 3 to 6, *Aspergillus ochraceus*, *Bartalinia* cf. *robillardoides*, *Beltraniella pirozynskii*, *Beltraniopsis* sp., *Calonectria gracilipes*, *Camposporium antennatum*, coelomycetes spp.1 to 4, *Chaetospermum* cf. *camelliae*, cf. *Chaetosphaeronema* sp.1, *Chalara alabamensis*, *Chalara aurea*, *Chalara* cf. *paramontellica*, *Cladosporium*-like spp.1 to 3, *Clonostachys setosa*, cf. *Coleophoma cylindrospora*, *Cryptophialoidea fasciculata*, *Cylindrocladium candelabrum*, *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocladium gracile*, *Cylindrocladium pauciramosum*, *Cylindrocladium scoparium*, *Dactylaria* cf. *acerosa*, *Dactylaria belliana*, *Dactylaria* cf. *fulva*, *Dactylaria fusiformis*, *Dactylaria naviculiformis*, *Dactylaria* cf. *sparsa*, *Dictyochoeta simplex*, *Dictyosporium alatum*, *Dinemasporium* spp.1 to 3, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium* seccion *Liseola* sp., *Fusicoccum* sp., cf. *Gilmaniella* sp., *Gliocladiopsis* cf. *elgholli*, *Gliocladiopsis tenuis*, *Guignardia* sp., *Helicosporium virescens*, hyphomycetes spp.1 to 6, *Idriella lunata*, *Idriella ramosa*, *Idriella* cf. *variabilis*, *Idriella* spp.1-3 to 5, *Lasiodiplodia theobromae*, *Menisporopsis pirozynskii*, *Menisporopsis theobromae*, *Metarhizium anisopliae*, sterile mycelium spp.4 to 18, *Mycoleptodiscus brasiliensis*, *Ochroconis* cf. *variabilis*, *Ochroconis* spp.1 a 3, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium viridicatum*, *Periconia*-like sp., *Periconia byssoides*, *Periconia* sp., cf. *Phialemonium* sp., *Phoma* spp.1 to 3, *Phomopsis* spp.4 to 6, *Pseudobotrytis terrestris*, *Pseudorobillarda* cf. *texana*, *Pseudotracylla dentata*, *Pyrenochaeta* sp., *Ramochloridium* cf. *apiculatum*, *Satchmopsis brasiliensis*, cf. *Scleroconidioma sphagnicola*, *Sclerostagonospora* sp., cf. *Scolecobasidiella tropicalis*, *Speiropsis scopiformis*, *Stachybotrys chartarum*, cf. *Stilbella bucidae*, *Subulispora longirostrata*, *Thozetella gigantea*, *Tritirachium* sp., *Vermicullariopsis immersa*, *Volutella minima*, *Xylaria* sp., *Xylariaceae* sp., *Wiesneriomyces laurinus*, *Zygosporium gibbum*, *Zygosporium oscheoides*.

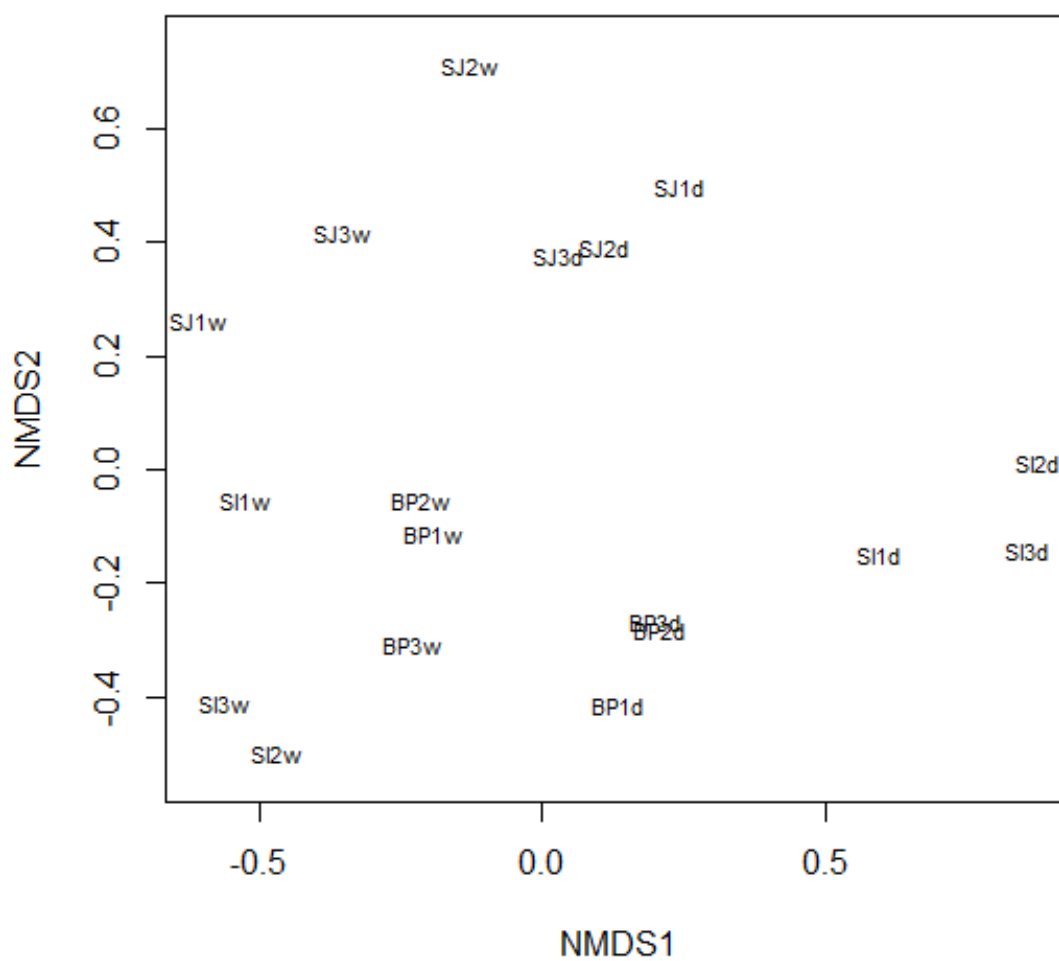


Figure 4. Ordering in two dimensions by NMDS communities of fungi associated with leaf litter of *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ). Stress = 0.19.

Table 3. Analysis of similarity percentage (SIMPER) of fungal communities isolated from leaf litter de *Vismia guianensis* during the wet (w) and dry (d) seasons in the Brejo Paraibano (BP), Serra da Ibiapaba (SI) and Serra da Jibóia (SJ)

Samples	Average dissimilarity (SIMPER in %)	Promoting species dissimilarity	Contribution (%)
BPw x BPd	58.1	ascomycete sp.2	14.7
		<i>Pestalotiopsis</i> spp.	13.9
		sterile mycelium sp.16	11.8
BPw x SIw	66.6	<i>I. cf. eucalypti</i>	25
BPw x SId	82.2	<i>P. carolinensis</i>	14.1
BPw x SJw	63.5	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	21.4
BPw x SJd ^a	60.5	-	-
BPd x SIw	79	<i>I. cf. eucalypti</i>	16.8
		ascomycete sp.2	10,5
BPd x SId	76.1	ascomycete sp.2	16.4
		<i>P. carolinensis</i>	15
		sterile mycelium sp.1	10.6
BPd x SJw	62.6	ascomycete sp.2	19.4
		sterile mycelium sp.1	11.9
BPd x SJd	72	ascomycete sp.2	18.3
		<i>Pestalotiopsis</i> spp.	13.3
		<i>P. carolinensis</i>	10.4
SIw x SId	83.8	<i>I. cf. eucalypti</i>	23.1
SIw x SJw	78.5	<i>I. cf. eucalypti</i>	22.9
SIw x SJd	73.9	<i>I. cf. eucalypti</i>	26.5
SId x SJw	76.7	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	16.3
		<i>P. carolinensis</i>	13.2
SId x SJd	76.7	<i>P. carolinensis</i>	10.6
SJw x SJd	64.3	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	28.1

5 CONCLUSÕES GERAIS

- O folheto de remanescentes da Mata Atlântica abriga uma grande diversidade de fungos sapróbios;
- Alguns aspectos metodológicos utilizados para a detecção e isolamento de fungos têm influências significativas para as estimativas da diversidade;
- O tempo de estocagem do folheto teve efeitos significativos sobre a diversidade de fungos associados ao folheto, enquanto que a temperatura de estocagem e o uso de diferentes meios de cultura não apresentaram diferenças significativas para o isolamento;
- A diversidade de fungos encontrada no folheto estocado por até 15 dias foi similar ao folheto fresco, ao passo que em períodos maiores de acondicionamento houve perdas significativas da riqueza e número de isolados de fungos;
- A comunidade de fungos sapróbios se distribui diferentemente entre as espécies de plantas estudadas, estações climáticas e áreas de coleta;
- Entre as plantas investigadas, *C. nemorosa* e *V. guianensis* presentes no mesmo ambiente, as comunidades foram distintas apresentando espécies comuns e exclusivas em ambas as plantas;
- A sazonalidade parece ser o fator determinante, influenciando a estruturação e composição da comunidade de fungos entre as plantas *C. nemorosa* e *V. guianensis* possivelmente por pertencerem as famílias botânicas filogeneticamente próximas;
- A comunidade de fungos de *V. guianensis* foi heterogênea no tempo e espaço, embora um grupo “core” de espécies foi recorrente;
- A maior similaridade observada entre as comunidades de fungos das áreas ambientalmente protegidas do Brejo Paraibano e Serra da Ibiapaba pode estar relacionada ao melhor estado de conservação das áreas e à proximidade geográfica;
- A menor diversidade encontrada em Serra da Jibóia pode estar relacionada aos efeitos das atividades antrópicas sobre a área;

- Os resultados indicam que as comunidades de fungos sapróbios nos remanescentes de Mata Atlântica não se distribuem aleatoriamente no ambiente, entretanto apresentam diferenças entre as amostras de fungos que ocorrem em habitats similares.

COMUNIDADES DE FUNGOS EM FOLHEDO DA MATA ATLÂNTICA NA REGIÃO SEMIÁRIDA DO BRASIL

Loise Araujo Costa

Resumo

A Mata Atlântica apresenta uma das maiores biodiversidade dentre as florestas tropicais sendo uma das 34 áreas prioritárias para a conservação mundial. Atualmente resta cerca de 11% da sua área original, que é composto por remanescentes fragmentados e distantes geograficamente. Dentre os micro-organismos que compõem os ecossistemas florestais, os fungos são componentes importantes, pois promovem a ciclagem de carbono e nutrientes, no entanto, são pouco estudados. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e distribuição de fungos associados ao folheto de três remanescentes de Mata Atlântica na região semiárida do Brasil: Brejo Paraibano-PB, Serra da Ibiapaba-CE e Serra da Jibóia-BA; bem como os efeitos de aspectos metodológicos sobre a micobiota. Duas expedições foram realizadas em cada área, uma durante a estação chuvosa e a outra na estação seca, entre junho/2011 e janeiro/2013. Vinte e três amostras de folhas da serapilheira, cinco de *Clusia nemorosa* G. Mey e dezoito de *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy, foram coletadas e submetidas à técnica de filtração de partículas. O volume total de 9.3 mL de suspensão de partículas foi plaqueado em dois meios de cultivo: ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol (DRBC) e ágar extrato de malte e levedura (MYE). A partir da análise desse material, 6.460 colônias foram isoladas e identificadas em 168 táxons cujos dados foram distribuídos em três capítulos. O primeiro capítulo avaliou os efeitos do tempo (material fresco, 07, 14, 21 e 28 dias) e temperatura (ambiente e 4°C) no acondicionamento das folhas de *C. nemorosa* além do uso dos dois meios de cultura sobre a micobiota. A análise de covariância indicou que a riqueza e o número de isolados diminuiriam com o tempo de acondicionamento, entretanto em relação ao meio de cultura não houve diferença significativa. A temperatura de acondicionamento não apresentou influência significativa sobre a comunidade, segundo o teste-t. O segundo capítulo comparou as comunidades de fungos de *C. nemorosa* e *V. guianensis* durante as estações chuvosa e seca. *Clusia nemorosa* apresentou maior riqueza de espécies e diversidade de fungos comparada a *V. guianensis*. A análise de similaridade indicou que as variações na comunidade entre as plantas e estações foram significativas, enquanto que a análise de agrupamento e a multivariada NMDS apresentaram a sazonalidade como fator

determinante para a distribuição dos fungos. O terceiro capítulo investigou a distribuição espacial e temporal da comunidade de fungos associada ao folhedo de *V. guianensis* presentes nos três remanescentes. A análise multivariada NMDS revelou diferenças na composição das comunidades de fungos em cada área e estação climática e a análise de similaridade indicou que as diferenças encontradas foram estatisticamente significativas. Os resultados deste estudo apresentam uma grande diversidade de fungos associada ao folhedo presente nos remanescentes de Mata Atlântica e indicam que a distribuição dos fungos no ambiente não é aleatória. O conhecimento dos efeitos dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição dos fungos sapróbios é fundamental para entender o papel que desempenham nos ecossistemas florestais.

Palavras-chave: fungos sapróbios, floresta tropical, microbiota, serapilheira.

COMMUNITIES OF FUNGI ON LEAF LITTER OF ATLANTIC FOREST IN THE SEMIARID REGION OF BRAZIL

Loise Araujo Costa

Abstract

The Atlantic Forest has the highest biodiversity among tropical forests is one of the 34 priority areas for global conservation. Currently remains about 11% of its original area, which is composed of fragmented and geographically distant remnants. Among the microorganisms that compose forest ecosystems, fungi are important components because ensure the cycling of carbon and nutrients, however are poorly studied. The present study aimed to assess the diversity and distribution of fungi associated to leaf litter from three Atlantic Forest remnants in the semiarid region of Brazil: Brejo Paraibano-PB, Serra da Ibiapaba-CE and Serra da Jibóia-BA; and the effects of methodological aspects on mycobiota. Two expeditions were conducted in each area, during the wet season and the other in the dry season, between June/2011 and January/2013. Twenty-three samples of leaf litter, five *Clusia nemorosa* G. Mey and eighteen *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy, were collected and submitted to the technique of particle filtration. The total volume of 9.3 mL of particle suspension was plated on two different culture media: dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC) and malt yeast extract agar (MYE). The analysis of this material yielded 6.460 colonies identified 168 taxa for which data were divided into three chapters. The first chapter evaluates the effects of time (fresh material, 07, 14, 21 and 28 d) and storage temperature (room temperature and 4°C) of the leaves of *C. nemorosa* plus the use of two culture media on mycobiota. Analysis of covariance indicated that the richness and the number of isolates decreased with storage, however in relation to the culture medium there was no significant difference. The storage temperature had no significant influence on the community according to the t-test. The second chapter compared the communities of fungi of *C. nemorosa* and *V. guianensis* during the wet and dry seasons. *Clusia nemorosa* showed higher species richness and diversity of fungi compared to *V. guianensis*. Similarity analysis indicated that variations in the community between plants and seasons were significant while the cluster analysis and multivariate NMDS showed seasonality factor as more decisive for the distribution of fungi. The third chapter investigated the spatial and temporal distribution of fungi associated with leaf litter community of *V. guianensis* present in the three remaining. Multivariate analysis NMDS

revealed differences in community composition of fungi in each area and climate season and the similarity analysis indicated that the differences were statistically significant. The results of this study presented a great diversity associated with the leaf litter present in remnants of Atlantic Forest and indicate that the distribution of fungi in the environment is not random. Knowledge of the effects of biotic and abiotic factors on the distribution of saprobic fungi is fundamental to understanding the role that they play in forest ecosystems.

Keywords: leaf litter, mycobiota, rainforest, saprobic fungi.

ANEXOS

AnexoI. Fungos sapróbios associados ao folheto de *Clusia nemorosa* (C) e *Vismia guianensis* (V) presentes nos remanescentes de Mata Atlântica na região semiárida: Serra da Jibóia, Brejo Paraibano e Serra da Ibiapaba

TÁXONS	SERRA DA JIBÓIA		BREJO PARAIBANO	SERRA DA IBIAPABA	TOTAL
	C	V	V	V	
<i>Acremonium</i> sp.1	11	0	0	0	11
<i>Acremonium</i> sp.2	0	2	0	0	2
<i>Acremonium</i> sp.3	2	0	0	0	2
<i>Ardhachandra cristaspora</i> (Matsush.) Subram. & Sudha	7	0	0	0	7
<i>Ardhachandra selenoides</i> (de Hoog) Subram. & Sudha	10	0	0	0	10
ascomiceto sp.1	0	2	271	11	284
ascomiceto sp.2	0	3	0	0	3
ascomiceto sp.3	7	3	0	0	10
ascomiceto sp.4	2	0	0	0	2
ascomiceto sp.5	0	2	0	0	2
ascomiceto sp.6	0	0	12	0	12
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	1	1	0	9	11
<i>Atrosetaphiale fragelliformis</i> Matsush.	10	0	0	0	10
<i>Bartalinia</i> cf. <i>robillardoides</i> Tassi	1	1	0	0	2
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.	101	64	5	110	280
<i>Beltraniella botryospora</i> Shirouzu & Tokum.	0	13	75	90	178
<i>Beltraniella pirozynskii</i> P.M. Kirk	0	0	2	0	2
<i>Beltraniopsis</i> sp.	0	0	0	2	2
<i>Calonectria gracilipes</i> Crous & Mchau	26	0	0	2	28
<i>Camposporium antennatum</i> Harkn.	0	0	1	0	1
celomiceto sp.1	1	0	0	5	6
celomiceto sp.2	8	4	0	0	12
celomiceto sp.3	0	0	0	6	6
celomiceto sp.4	0	0	4	0	4
cf. <i>Chaetosphaeronema</i> sp.1	0	0	1	6	7
cf. <i>Chaetosphaeronema</i> sp.2	1	0	0	0	1
cf. <i>Coleophoma cylindrospora</i> (Desm.) Höhn.	2	2	3	38	45
cf. <i>Gilmaniella</i> sp.	0	0	0	1	1
cf. <i>Phialemonium</i> sp.	0	0	0	1	1
<i>Chaetospermum</i> cf. <i>camelliae</i> Agnihothr.	0	0	2	0	2
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	34	96	39	11	180
<i>Chalara alabamensis</i> Morgan-Jones & E.G. Ingram	0	2	0	0	2
<i>Chalara aurea</i> (Corda) S. Hughes	0	0	0	7	7
<i>Chalara paramontellica</i> McKenzie	2	3	0	0	5
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i> (Pers.) W. Gams & Hol.-Jech.	0	0	0	1	1
<i>Cladosporium-like</i> sp.1	3	0	10	0	13

<i>Cladosporium-like</i> sp.2	0	0	3	0	3
<i>Cladosporium-like</i> sp.3	0	0	0	7	7
<i>Clonostachys setosa</i> (Vittal) Schroers	0	0	1	0	1
<i>Cryptophialoidea fasciculata</i> Kuthub. & Nawawi	0	5	0	0	5
<i>Curvularia geniculata</i> (Tracy & Earle) Boedijn	1	0	0	0	1
<i>Cylindrocladium gracile</i> (Bugnic.) Boesew.	44	0	13	0	57
<i>Cylindrocladium candelabrum</i> Viégas	0	1	0	0	1
<i>Cylindrocladium floridanum</i> Sobers & C.P. Szym.	0	2	0	0	2
<i>Cylindrocladium pauciramosum</i> C.L. Schoch & Crous	0	1	0	4	5
<i>Cylindrocladium scoparium</i> Morgan	0	0	2	0	2
<i>Dactylaria</i> cf. <i>acerosa</i> Matsush.	0	4	2	4	10
<i>Dactylaria belliana</i> B.C. Paulus, Gadek & K.D. Hyde	132	0	1	4	137
<i>Dactylaria</i> cf. <i>biseptata</i> Matsush.	18	0	17	56	91
<i>Dactylaria</i> cf. <i>fulva</i> R.Y. Roy & Gujarati, Lloydia	0	0	1	0	1
<i>Dactylaria fusiformis</i> Shearer & J.L. Crane	0	0	4	1	5
<i>Dactylaria</i> cf. <i>naviculiformis</i> Matsush.	0	0	1	0	1
<i>Dactylaria</i> cf. <i>sparsa</i> R.F. Castañeda & W.B. Kendr.	0	0	0	1	1
<i>Dictyochoaeta novae-guineensis</i> (Matsush.) A.I. Romero	1	0	0	0	1
<i>Dictyochoaeta simplex</i> (S. Hughes & W.B. Kendr.) Hol.-Jech.	3	0	8	43	54
<i>Dictyosporium alatum</i> Emden	0	0	0	1	1
<i>Dinemasporium</i> sp.1	0	0	0	3	3
<i>Dinemasporium</i> sp.2	0	4	0	0	4
<i>Dinemasporium</i> sp.3	0	0	1	0	1
<i>Fusarium decemcellulare</i> Brick	2	0	0	3	5
<i>Fusarium incarnatum</i> (Roberge) Sacc.	0	0	1	0	1
<i>Fusarium lateritium</i> Nees	14	0	0	0	14
<i>Fusarium</i> seção <i>Liseola</i> sp.	0	0	5	0	5
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	17	0	0	0	17
<i>Fusicoccum</i> sp.	0	0	0	37	37
<i>Gliocladiopsis</i> cf. <i>elgholli</i> L. Lombard & Crous	73	0	0	2	75
<i>Gliocladiopsis</i> cf. <i>mexicana</i> L. Lombard & Crous	10	0	0	0	10
<i>Gliocladiopsis tenuis</i> (Bugnic.) Crous & M.J. Wingf.	0	0	0	3	3
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	53	85	116	65	319
<i>Guignardia</i> sp.	28	7	20	24	79
<i>Gyrotrix</i> cf. <i>pediculata</i> J.L. Cunn.	0	5	13	77	95
<i>Helicosporium virescens</i> (Pers.) Sivan.	0	0	0	1	1
hifomiceto sp.1	3	0	0	0	3
hifomiceto sp.2	0	0	0	1	1
hifomiceto sp.3	0	0	1	0	1
hifomiceto sp.4	1	0	1	0	2

hifomiceto sp.5	0	1	0	0	1
hifomiceto sp.6	0	0	1	0	1
hifomiceto sp.7	0	0	1	0	1
<i>Idriella cubensis</i> R.F. Castañeda & G.R.W. Arnold	2	0	0	0	2
<i>Idriella lunata</i> P.E. Nelson & S. Wilh.	16	3	0	14	33
<i>Idriella ramosa</i> Matsush.	6	0	14	0	20
<i>Idriella</i> sp.1	0	0	1	0	1
<i>Idriella</i> sp.2	11	11	8	62	92
<i>Idriella</i> sp.3	1	0	0	2	3
<i>Idriella</i> sp.4	0	0	1	0	1
<i>Idriella</i> sp.5	3	0	0	6	9
<i>Idriella variabilis</i> Matsush.	31	1	2	0	34
<i>Immersidiscosia</i> cf. <i>eucalypti</i> (Pat.) Kaz. Tanaka, Okane & Hosoya	0	0	0	349	349
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.	3	0	10	0	13
<i>Menisporopsis pirozynskii</i> Varghese & V.G. Rao	0	0	1	0	1
<i>Menisporopsis theobromae</i> S. Hughes	1	0	41	0	42
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	5	0	1	0	6
micélio estéril sp.1	10	3	112	38	163
micélio estéril sp.2	0	0	0	18	18
micélio estéril sp.3	26	14	0	56	96
micélio estéril sp.4	9	3	69	36	117
micélio estéril sp.5	21	7	3	2	33
micélio estéril sp.6	4	17	1	2	24
micélio estéril sp.7	102	16	10	7	135
micélio estéril sp.8	21	0	20	4	45
micélio estéril sp.9	50	1	6	10	67
micélio estéril sp.10	51	20	30	17	118
micélio estéril sp.11	11	6	0	23	40
micélio estéril sp.12	23	6	18	10	57
micélio estéril sp.13	0	3	0	0	3
micélio estéril sp.14	0	2	0	0	2
micélio estéril sp.15	17	0	0	4	21
micélio estéril sp.16	0	20	134	0	154
micélio estéril sp.17	2	0	0	1	3
micélio estéril sp.18	0	0	0	40	40
<i>Mycoleptodiscus brasiliensis</i> B. Sutton & Hodges	0	0	2	0	2
<i>Mycoleptodiscus terrestris</i> (Gerd.) Ostaz.	1	0	0	0	1
<i>Neofusicoccum</i> sp.	1	0	0	0	1
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	0	0	2	1	3
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason	1	0	0	0	1
<i>Ochroconis</i> sp.1	0	0	0	1	1
<i>Ochroconis</i> sp.2	2	0	0	0	2
<i>Ochroconis</i> sp.3	0	7	0	0	7

<i>Ochroconis</i> cf. <i>variabilis</i> (G.L. Barron & L.V. Busch) de Hoog & Arx	1	3	6	2	12
<i>Paliphora intermedia</i> Alcorn & B. Sutton	1	0	0	0	1
<i>Parasympodiella laxa</i> (Subram. & Vittal) Ponnappa	7	0	0	0	7
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	40	18	0	10	68
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx	57	37	11	41	146
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	0	0	0	1	1
<i>Penicillium rugulosum</i> Thom	0	0	13	21	34
<i>Periconia byssoides</i> Pers.	0	0	4	0	4
<i>Periconia</i> sp.	0	0	0	2	2
<i>Periconia-like</i> sp.	0	0	1	0	1
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	128	174	158	78	538
<i>Phoma</i> sp.1	0	0	0	4	4
<i>Phoma</i> sp.2	0	0	5	3	8
<i>Phoma</i> sp.3	0	0	0	3	3
<i>Phomopsis</i> sp.1	18	13	50	17	98
<i>Phomopsis</i> sp.2	39	23	41	21	124
<i>Phomopsis</i> sp.3	5	10	59	14	88
<i>Phomopsis</i> sp.4	46	0	0	0	46
<i>Phomopsis</i> sp.5	0	0	1	0	1
<i>Phomopsis</i> sp.6	0	0	11	0	11
<i>Pseudobotrytis terrestris</i> (Timonin) Subram.	0	0	0	1	1
<i>Pseudomassaria carolinensis</i> M.E. Barr & Hodges	122	167	322	61	672
<i>Pseudorobillarda</i> cf. <i>texana</i> Nag Raj	0	0	0	91	91
<i>Pseudotracylla dentata</i> B. Sutton & Hodges	0	0	3	0	3
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	0	1	3	0	4
<i>Ramochloridium apiculatum</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) de Hoog	0	0	0	1	1
<i>Satchmopsis brasiliensis</i> B. Sutton & Hodges	1	40	0	0	41
<i>Scleroconidioma</i> cf. <i>sphagnicola</i> Tsuneda, Currah & Thormann	0	0	1	0	1
<i>Sclerostagonospora</i> sp.	14	0	1	1	16
<i>Scolecobasidiella</i> cf. <i>tropicalis</i> R.F. Castañeda & G.R.W. Arnold	1	5	0	0	6
<i>Selenodriella fertilis</i> (Piroz. & Hodges) R.F. Castañeda & W.B. Kendr.	1	0	0	0	1
<i>Speiopsis scopiformis</i> Kuthub. & Nawawi	27	0	1	6	34
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	0	1	0	0	1
<i>Stilbella</i> cf. <i>bucidae</i> R.F. Castañeda & W.B. Kendr.	0	0	0	2	2
<i>Subulispora longirostrata</i> Nawawi & Kuthub.	0	1	3	2	6
<i>Thozetella cristata</i> Piroz. & Hodges	12	7	40	32	91
<i>Thozetella gigantea</i> B.C. Paulus, Gadek & K.D. Hyde	3	1	20	24	48
<i>Trichoderma</i> sp.	12	0	0	0	12
<i>Tritirachium</i> sp.	0	0	0	1	1
<i>Vermiculiariopsiella immersa</i> (Desm.) Bender	0	3	55	0	58
<i>Verticillium</i> sp.	46	0	0	0	46

<i>Volutella minima</i> Höhn.	84	1	2	1	88
<i>Wiesneriomyces laurinus</i> (Tassi) P.M. Kirk	8	5	15	25	53
<i>Xylaria</i> sp.	0	0	1	0	1
Xylariaceae sp.	1	0	1	0	2
<i>Zygosporium gibbum</i> (Sacc., M. Rousseau & E. Bommer) S. Hughes	0	0	2	0	2
<i>Zygosporium masonii</i> S. Hughes	1	0	0	0	1
<i>Zygosporium oscheoides</i> Mont.	0	0	3	0	3
TOTAL	1.735	963	1.957	1.805	6.460

Anexo II

RESERVA JEQUITIBÁ - Serra da Jibóia - Elísio Medrado - Bahia

Pluviosidade - 2011

Dias	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	mm
												Dez
1							6					
2												
3							9					
4												
5												
6												
7				25			35					
8				6							35	
9											12	
10	10			4								
11				6							12	
12	5											129
13	5										25	
14				6		36						
15				15					15			
16						7						13
17				48			9					
18				8						29		
19												35
20									25			
21												
22			9				24			12	12	
23			20					34		16	15	
24			10							8		

25			15							10		
26										18		
27	10								20			
28				18			12					
29							18					
30				10		40						
31												
Total Mensal	30	Si	54	146	Si	83	113	34	60	93	111	177
Média Mensal	0.97		1.74	4.71		2.68	3.65	1.10	1.94	3.00	3.58	5.71

Sem
informação Si

Total Anual - mm	901
Média Anual - mm	0.97

RESERVA JEQUITIBÁ - Serra da Jibóia - Elísio Medrado - Bahia

Pluviosidade - 2012

Dias	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	mm
												Dez
1												
2												
3							10	4				
4							22	5		22		
5	15				15		30			5	55,5	
6							24				52	
7										15		
8						4				10		
9									10			
10							16	5	5			
11			12			20		6			15	
12								15				
13												
14						10						
15						6		15				
16								25				
17												
18								5				
19												
20												
21					4			10				
22					4	5		12				
23					10	4						
24						2		20				
25						0						
26						7						
27						20						

28						8						
29						36						
30						7						
31												
Total Mensal	15	0	12	0	33	129	102	122	15	52	107,5	0
Média Mensal												

Sem
informação Si

Total Anual - mm	587,5
Média Anual - mm	-

RESERVA JEQUITIBÁ - Serra da Jibóia - Elísio Medrado - Bahia

Pluviosidade - 2013

												<i>mm</i>
Dias	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1								2				
2							2	4				
3							15	9				
4							8	7				
5							5	15				
6						6.5	10	12				
7							12	17				
8						15	5					
9						10	8	7				
10						12						
11												
12						15						
13					20		26					
14												
15												
16						7.5		2				
17								6				
18				13								
19												
20			15		7		7	25				
21							16					
22					15							
23												
24							2					
25				10			18					
26				5			80					

27							6					
28					2		8					
29												
30												
31												
Total Mensal			15	28	44	66	228	106				
Média Mensal			0.48	0.90	1.42	2.13	7.35	3.42				

Sem
informação Si

Total Anual - mm	487
Média Anual - mm	0.52



INMET- Instituto Nacional de Meteorologia
 Brejo Paraibano - Posto Meteorológico de Areia
 Precipitação: 2005-2012

ANO	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	mm
												Dez
2005	15.5	45.2	25.7	57.1	246.5	342	90.7	232.1	35.7	10.2	6.5	53.7
2006	5.8	36.8	130.8	165.5	122.1	178	117.2	162.7	53.8	9.2	56.2	24.2
2007	49.4	104.7	105.3	211.7	151	286.4	158.5	156.8	159	20.7	30.9	60.4
2008	114.1	4.7	307.3	149.5	190.5	216.9	222.7	238.1	76.4	21.3	4.3	13.6
2009	48.9	171.5	83.2	245.2	271.4	212.2	319.6	183.4	40.4	3.6	13.6	36.5
2010	125.4	45.1	97.8	137.2	50.3	180.6	136.4	105.5	59.6	15.4	2.7	64.4
2011	140.7	48.5	82.6	280.2	462.4	181.4	363	156.9	19.9	13.8	48.3	29.9
2012	182.8	154.4	34.5	32.1	102.5	302.2	163.3	25.9	6.7	13.9	0.8	5.6

FUNCEME – Fundação Cearense de Meteorologia e recursos Hídricos

Serra da Ibiapaba- Posto Meteorológico de Uabjara

Precipitação: 2005-2012

ANO	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	mm
												Dez
2005	87.2	132.6	437.8	243.3	178.2	104	0	Si	Si	Si	Si	74.2
2006	14.4	341.5	496.6	238.1	261.5	94.9	7.5	0	0	0	0	31.7
2007	67	399.5	155.8	426.8	49.9	89.6	13	Si	0	20	0	33
2008	274.6	209.2	467.2	577.7	267	583	23.2	Si	21	Si	Si	Si
2009	237.2	357.5	598.2	553.6	387	266.2	109.5	24	0	0	0	22
2010	96.8	40.4	97.6	233.6	144.8	82.8	1.6	0	0	146.2	4.2	94.4
2011	310.4	155.8	271.6	576.6	259.3	73.2	53.6	6	Si	38	Si	Si
2012	86.2	173.2	177.8	113.4	24.4	36.2	0.4	Si	Si	0.2	0.6	3.6

Si – Sem informação