

Ana Lucia de Jesus

Diversidade de Oomycota em área de manguezal do  
Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia,  
Estado de São Paulo, Brasil

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

SÃO PAULO

2015

Ana Lucia de Jesus

Diversidade de Oomycota em área de manguezal do  
Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia,  
Estado de São Paulo, Brasil

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

ORIENTADORA: Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli

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

Jesus, Ana Lucia de  
J58d Diversidade de Oomycota em área do Parque Estadual da Ilha do  
Cardoso (PEIC), Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil / Ana Lucia de Jesus – São  
Paulo, 2015  
108 p. il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio  
Ambiente, 2015  
Bibliografia

1.Fungos zoospóricos. 2. Mangue. 3. Halophytophthora. I. Título

CDU: 582.281

*” Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

Dedico a minha querida avó Anna Maria do Carmo

(*in memoriam*), que foi tudo na minha vida.

Saudades eternas!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus por guiar os meus passos, dando condições para eu lutar e alcançar todos os meus objetivos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio e subsídio através da bolsa no período inicial do Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2013/01409-0) pelo apoio e subsídio através da bolsa de Mestrado, e pelo apoio financeiro ao projeto (FAPESP processo 2012/50222-7) “Diversidade de Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Hyphochytriomycota e Oomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil”.

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

Ao Instituto Florestal pela autorização concedida para a realização das coletas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo.

À minha orientadora Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli pela amizade, dedicação, paciência e profissionalismo que me conduz desde a iniciação científica. Por todos os incentivos e críticas o qual me conduziram a buscar e querer sempre o melhor. Obrigada por tudo!

À Dra. Agostina Virginia Marano e ao Dr. José Ivanildo de Souza pela amizade, prazerosa companhia e imensa contribuição no meu trabalho. Aprendi muito com vocês!

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório: Danilo Reis Gonçalves, Gustavo Henrique Jerônimo, Marcela Castilho Boro e Sarah Cristina de Oliveira Rocha, pela prazerosa companhia e discussões que possibilitaram novos trabalhos e o enriquecimento pessoal. Espero que essa parceria vá além desse período no Instituto de Botânica.

Aos meus queridos amigos: Alex Almeida, Ana Cristina Bolanões, Ana Lúcia Vardiero Ribeiro, Cecília Mayumi Ishida, Cynthia Lebrão, Damaris Venturini, Fernanda Karstedt, Jadson

Oliveira, Larissa Bernardino Moro, Leonice Pedrosa, Luci Okino, Mauro Westphalen, Nelson Menolli Junior, Ricardo Matheus Pires, Viviana Motato Vasquez, pela companhia prazerosa nos congressos, reuniões, apresentação de trabalhos, discussões sobre análises moleculares e nos momentos de descontração que proporcionaram novas descobertas e muitas risadas. Jamais esquecerei desses momentos.

Ao meu querido amigo Alan Borges de Souza pelo apoio durante a fase experimental desse trabalho enquanto estive trabalhando no Núcleo de Pesquisa em Micologia.

Ao Dr. Timothy Young James por todo apoio e paciência oferecido durante o período em que estive no Instituto de Botânica, auxiliando durante as realizações de estudos moleculares, desde a extração de DNA até a realização das primeiras análises filogenéticas. Aprendi muito com você!

Ao Dr. Eduardo Leão pelo auxílio no início deste trabalho, ajudando com a primeira coleta, auxiliando nas primeiras identificações dos oomicetos marinhos.

Ao Dr. Marcelo Barrera por ser essa pessoa amigável, pelo ensinamento sobre análises ecológicas e principalmente por tentar me animar quando os resultados não eram como eu esperava.

Ao Prof. Dr. Eduardo Pereira Cabral Gomes por ter auxiliado esclarecendo minhas dúvidas quanto aos dados ecológicos.

Ao Manoel Osório Neves Junior por nos conduzir, apresentar o Núcleo Perequê e auxiliar durante as coletas.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Micologia: Adriana de Mello Gugliotta, Iracema Helena Schoenlein-Crusius, José Ivanildo de Souza, Marcelo Marcelli, Marina Capelari, Marli Gomes Lima do Nascimento, Michel Navarro Benatti, Rosely Ana Piccolo Grandi, Rosimeire Inácio, Vera Vitali, pelo carinho e pela boa convivência ao longo desses quatro anos.

À minha saudosa avó Anna Maria do Carmo (*in memoriam*) por todas as lições que me fizeram correr atrás dos meus sonhos. Saudades eternas!

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

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

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

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

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



## RESUMO

Organismos do filo Oomycota, também conhecidos como “fungus-like”, são comumente encontrados nos diferentes ecossistemas aquáticos e terrestres. Em área de manguezal, onde ocorre constante flutuação de maré, a temperatura, o pH e a salinidade são fatores determinantes para a ocorrência destes organismos. Para o levantamento da diversidade de oomicetos de uma área de manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, Estado de São Paulo foram realizadas quatro amostragens ao longo de um ano, com coleta de amostras de água e folhas (*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.) em locais com diferentes salinidades. As amostras foram processadas no laboratório utilizando-se duas técnicas, a primeira por meio da iscagem com semente de *Sorghum* spp. e epiderme de cebola, e a segunda direcionada apenas para as amostras de folhas, as quais foram diretamente colocadas em meio de cultura PYG (1,25 g de peptona de carne, 1,25 g de extrato de levedura, 3 g de glicose, 12 g de ágar, 500 mL de água do mar filtrada e 500 mL de água destilada) e V8 (200 mL de V8, 3 g de CaCO<sub>3</sub>, 12 g de ágar, 500 mL de água do mar filtrada e 500 mL de água destilada), preparados de acordo com a salinidade de cada amostra. Para caracterização dos locais de coleta foram mensurados o pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade elétrica, a temperatura e a salinidade. De um total de 571 amostras analisadas, foram obtidos 146 isolados, 111 pertencentes ao gênero *Halophytophthora* e 35 pertencentes aos gêneros *Achlya* (5), *Aphanomyces* (1), *Dictyuchus* (1), *Phytophthora* (8), *Phytopythium* (5) e *Pythium* (15), com o relato de dezessete espécies. Sequências (249) de diferentes regiões gênicas (SSU, ITS total e LSU do rDNA e COX I do mDNA) de isolados de oomicetos deste estudo e de isolados de *Halophytophthora* e *Salisapilia* importadas do “CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre”, Utrecht, Holanda, possibilitou a identificação de novas espécies para a ciência, duas pertencentes ao gênero *Halophytophthora*, duas pertencentes ao gênero *Phytophthora*, uma pertencente ao gênero *Achlya* e uma nova variedade para *Halophytophthora spinosa*. Todas as espécies do gênero *Halophytophthora*, bem como *Phytopythium kandeliae* e *Pythium grandisporangium* são reportados pela primeira vez no Brasil. Todas as citações são novas para o PEIC. Os índices de diversidade demonstraram uma

comunidade diversa e com distribuição uniforme dos táxons ao longo do período de estudo, nos diferentes tipos de amostras. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou não haver diferença significativa entre a abundância e a composição de espécies nas folhas de *R. mangle* e *L. racemosa*, e nem entre as salinidades; no entanto, evidenciou diferença significativa entre as coletas. Este é o primeiro estudo com oomicetos em área de manguezal no país.

Palavras-chave: diversidade, *Halophytophthora*, Mangue, Oomycota

## ABSTRACT

Organisms of Oomycota phylum, also known as “fungus-like”, are commonly found in different aquatic and terrestrial ecosystems. In mangrove areas, where is constant the fluctuation of tide, temperature, pH and salinity are determinant factors affecting the occurrence of these organisms. To survey the diversity of oomycetes in a mangrove area in "Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)", Cananéia, São Paulo State, four sampling were performed along one year, where water and leaves samples were collected (*Rhizophora mangle* L. and *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.) in sites with different salinities. The samples were processed in laboratory baiting them with *Sorghum* spp. seeds and onion skins. Besides this technique, the leaves were also placed directly in culture media PYG (peptone, glucose and agar) and V8 (V8 juice, CaCO<sub>3</sub> and agar), prepared according to the salinity of each sample. To characterize the sampling sites, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity, temperature and salinity were measured. A total of 571 samples were analyzed and 146 isolates obtained, 111 belonging to the genus *Halophytophthora* and 35 to the genera *Achlya* (5), *Aphanomyces* (1), *Dictyuchus* (1), *Phytophthora* (8), *Phytopythium* (5) and *Pythium* (15), with 17 species identified. Sequences (249) of different genetic regions (SSU, total ITS and LSU of rDNA and COX I of mDNA) of the oomycetes from this study and isolates of *Halophytophthora* and *Salisapilia* imported from CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, allowed the identification of new species to science, two belonging to the genus *Halophytophthora*, two belonging to the genus *Phytophthora*, one belonging to the genus *Achlya* and one new variety of *Halophytophthora spinosa*. All species of *Halophytophthora*, *Phytopythium kandeliae* and *Pythium grandisporangium* are firstly recorded for Brazil. All records are new to PEIC. The biodiversity indices indicated a diversity community and an uniform distribution of the taxa throughout the studied period in different types of samples. The Kruskal-Wallis test showed no significant differences between the abundance and composition of species in the leaves of *R. mangle* and *L. racemosa* and salinities, however, it showed significant differences among the four sampling periods. This is the first study of oomycetes in mangrove area in Brazil.

Key words: diversity, *Halophytophthora*, mangrove, Oomycota

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
<b>1. Caracterização da área de estudo</b> .....	17
1.1. O Bioma Mata Atlântica.....	17
1.2. Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC).....	18
<b>2. Coletas</b> .....	19
<b>3. Fatores abióticos mensurados nos locais de coleta</b> .....	21
<b>4. Processamento das amostras</b> .....	21
<b>5. Análise da comunidade de Oomycota presente nas amostras</b> .....	22
<b>6. Análise molecular</b> .....	23
6.1. Produção de biomassa .....	23
6.2. Extração de DNA.....	24
6.3. Amplificação e purificação do DNA .....	24
6.4. Sequenciamento.....	24
6.5. Tratamento das sequências .....	25
6.6. Análises filogenéticas .....	25
<b>7. Testes de Salinidade</b> .....	25
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>1. Caracterização dos fatores abióticos</b> .....	26
<b>2. Análise da Diversidade</b> .....	27
<b>3. Análise da comunidade</b> .....	47
<b>4. Análises filogenéticas</b> .....	68
4.1. Ordem Peronosporales <i>sensu lato</i> .....	71
4.2. Ordem Saprolegniales.....	81
<b>CONCLUSÕES</b> .....	85
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	86
<b>ANEXOS</b> .....	97

# INTRODUÇÃO

Oomycota é um grupo monofilético de organismos pertencentes ao Reino Straminipila, também conhecidos como “Fungus-Like”, por possuírem características semelhantes aos fungos verdadeiros como forma de nutrição, zoósporos flagelados, parede celular composta por quitina, presença de hifas, formação de estruturas de resistência e por ocuparem os mesmos nichos ecológicos (Neuhauser *et al.* 2012, Marano *et al.* 2014a, Beakes *et al.* 2014).

Este filo pertence ao Super grupo SAR, o qual é composto pelos Reinos Straminipila, Alveolata e Rhizaria (Adl *et al.* 2012). Numa primeira tentativa de agrupamento dos reinos em super grupos, Adl *et al.* (2005) propuseram a inserção do reino Straminipila no Super grupo Chromoalveolata, juntamente com Alveolata, Haptophyta e Cryptophyceae, agrupamento sustentado pela hipótese da presença de plastídios comuns entre os heterotróficos eucariontes e as algas vermelhas. Como foi verificada a presença de grupos polifiléticos neste agrupamento, foi proposta a classificação hoje aceita onde Straminipila e Alveolata estão especialmente mais relacionados com Rhizaria (SAR). Haptophyta e Cryptophyceae foram excluídos do agrupamento e suas posições ainda são incertas.

Kirk *et al.* (2008), o mais recente dicionário de fungos, apresenta o filo Oomycota com uma única classe, Oomycetes, esta composta por 13 ordens, 25 famílias, 106 gêneros e 956 espécies. Recentemente, Beakes *et al.* (2014) em uma revisão filogenética e taxonômica, utilizando principalmente dados de sequências moleculares e analisando a biologia juntamente com a história evolutiva do Reino Straminipila, propuseram uma nova classificação para os representantes do filo Oomycota. Esta classificação divide o filo em três classes: Peronosporomycetes com as ordens Albuginales, Peronosporales *sensu lato* e Rhipidiales; Saprolegniomycetes com Atkinsiellales, Leptomitales e Saprolegniales; e uma considerada *Incertae sedis* composta por organismos basais das ordens Eurychasmales, Haptoglossales, Olpidiopsidales *sensu lato*, Haliphthorales, e uma ordem *Incertae sedis* com os gêneros *Pseudosphaerita* e *Rozellopsis*.

Os oomicetos representantes desse filo são encontrados como sapróbios ou parasitas nos diversos ecossistemas aquáticos (água doce, salobra e marinha) e terrestres; no entanto, as espécies com potencial patogênico em plantas e animais são as mais conhecidas (Beakes *et al.* 2012). Estes organismos possuem alta plasticidade morfológica, apresentando talo holocárpico (unicelular) ou eucárpico (micelial); hifas cenocíticas com septos para delimitação das estruturas reprodutivas; reprodução assexuada normalmente por meio de zoósporos biflagelados (liso e mastigonemático) produzidos dentro de zoosporângios; e a sexuada alcançada pelo contato de gametângios femininos (oogônios) e masculinos (anterídios), por copulação de gametângios (onde todo o talo se comporta como um gametângio ou por partenogênese (onde o gametângio feminino é fecundado sem a presença do gametângio masculino) (Alexopoulos *et al.* 1996).

Em áreas de manguezal os oomicetos atuam, juntamente com as bactérias e outros fungos, como importantes decompositores de substratos foliares (Fell & Master 1973, Newell 1976, Leño 2002, Nakagiri 2002), pois degradam açúcares simples, carbono, nitrogênio, celulose, hemicelulose, lignina, proteínas (quitina e queratina), ácidos húmicos, entre outros (Moore-Landecker 1996). O manguezal, importante ecossistema de transição entre ambiente terrestre e marinho, é característico de regiões tropicais e subtropicais do mundo (Cintron *et al.* 1983, Cunha-Lignon 2001, Middleton & Mckee 2001), sendo considerado um dos ecossistemas mais férteis e produtivos dos ecossistemas marinhos (Sessegono & Lana 1991), já que exportam grandes quantidades de matéria orgânica para os estuários, principalmente na forma de serapilheira, as quais entram nas cadeias alimentares e contribuem para a produtividade primária na zona costeira (Odum & Heald 1975).

A presença de oomicetos em área de manguezal já revelada em diversas partes do mundo (Newell *et al.* 1987, Nakagiri *et al.* 1989, Raghukumar *et al.* 1995, Leño *et al.* 1998, Marano *et al.* 2012), está subordinada a tolerância às flutuações de temperatura, pH e salinidade que normalmente ocorrem neste ecossistema (Leño *et al.* 1998). Gêneros como *Ectrogella*, *Eurychasma*, *Eurychasmidium*, *Haliphthoros*, *Halodaphnea*, *Halophythphora*, *Lagenisma*, *Pontisma*, *Salilagenidium*, *Salisapilia* e *Sirolpidium* possuem espécies exclusivamente marinhas ou estuarinas

(Marano *et al.* 2012). Entre estas espécies as pertencentes ao gênero *Halophytophthora* são consideradas as mais frequentes colonizadoras de folhas submersas de mangue (Newell *et al.* 1987, Nakagiri *et al.* 1989, Newell & Fell 1992, Tan & Pek 1997). Sua abundância é atribuída ao amplo limite de tolerância das condições flutuantes, alta produção de zoósporos, eficiência no mecanismo de fixação no substrato e zoósporos quimiotáticos (Leaño *et al.* 1998), com rápida colonização das folhas após a submersão das mesmas (Newell *et al.* 1987, Nakagiri 2000). *Halophytophthora vesicula* é a espécie mais comum, podendo ser encontrada em até 90% das amostras (Kohlmeyer & Kohlmeyer 1979, Newell & Fell 1997). Esta espécie é tipo do gênero, tendo sido descrita por Anastasiou & Churchland (1969), a partir de folhas de *Prunus laurocerasus* L. no Canadá.

Estudos moleculares com oomicetos têm sido principalmente realizados com os representantes de grande importância econômica, com várias abordagens sendo testadas para resolver o complexo de espécies e suas relações filogenéticas (Levesque & de Cock 2004, Robideau *et al.* 2011, Robideau *et al.* 2014, Beakes *et al.* 2014, de Cock *et al.* 2015, Thines 2014), porém a falta de material bem identificado e de sequências confiáveis disponíveis no GenBank trazem complicações para o estabelecimento destas relações.

No Brasil são conhecidas 195 espécies de oomicetos (20,4% das espécies descritas no mundo), com a maioria delas citadas para o estado de São Paulo (66%), onde se concentra o maior número de especialistas no grupo. Os estudos taxonômicos foram especialmente realizados em regiões de Mata Atlântica (Beneke & Rogers 1962; Rogers *et al.* 1970; Milanez & Trufem 1981, 1984; Schoenlein-Crusius *et al.* 1992; Milanez *et al.* 1994a,b, 1996, 2003; Pires-Zottarelli *et al.* 1995, 1996a,b; Schoenlein-Crusius & Milanez 1998; Rocha & Pires-Zottarelli 2002; Gomes & Pires-Zottarelli 2006, 2008; Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Miranda & Pires Zottarelli 2008, 2012; Jesus *et al.* 2013); no entanto, para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), importante fragmento preservado de Mata Atlântica, nenhum relato havia sido feito até então.

Considerando-se a importância ecológica dos manguezais e dos oomicetos e a ausência de informações sobre este grupo de organismo neste ecossistema no Brasil, o presente estudo teve como



objetivo principal avaliar a riqueza e a diversidade dos oomicetos de água e de folhas submersas em processo de decomposição em uma área de manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia (SP).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Identificação das espécies de Oomycota coletadas de área de manguezal, mediante caracterização morfológica e molecular (regiões 18S, ITS e 28S do rDNA e COX I do mDNA);
- (ii) Comparação da riqueza e diversidade de espécies obtidas em água e em folhas submersas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*;
- (iii) Ampliação de informação molecular dos oomicetos no GenBank;
- (iv) Ampliação do acervo da CCIBt (Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica) por meio da inclusão de espécimes de Oomycota.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Caracterização da área de estudo

#### 1.1. O Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica, segunda maior floresta pluvial do continente americano, é apontada como um dos 34 *hotspots* mundiais, ou seja, uma das grandes prioridades para a conservação da biodiversidade em todo o mundo (Tabarelli *et al.* 2005, Mittermeier *et al.* 2011). Originalmente ocupava 15% do território brasileiro nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí. No estado de São Paulo, devido principalmente a exploração econômica, restam apenas 7,8% do território anteriormente ocupado por este bioma (Campanili & Prochnow 2006).

Uma das medidas adotadas para a preservação da Mata Atlântica foi a criação de áreas de proteção integral (reservas, parques, estações ecológicas e reservas privadas); porém, estas áreas protegidas cobrem apenas 2% da Mata Atlântica (Tabarelli *et al.* 2005). Uma destas áreas de proteção ambiental é o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), local escolhido para este estudo.

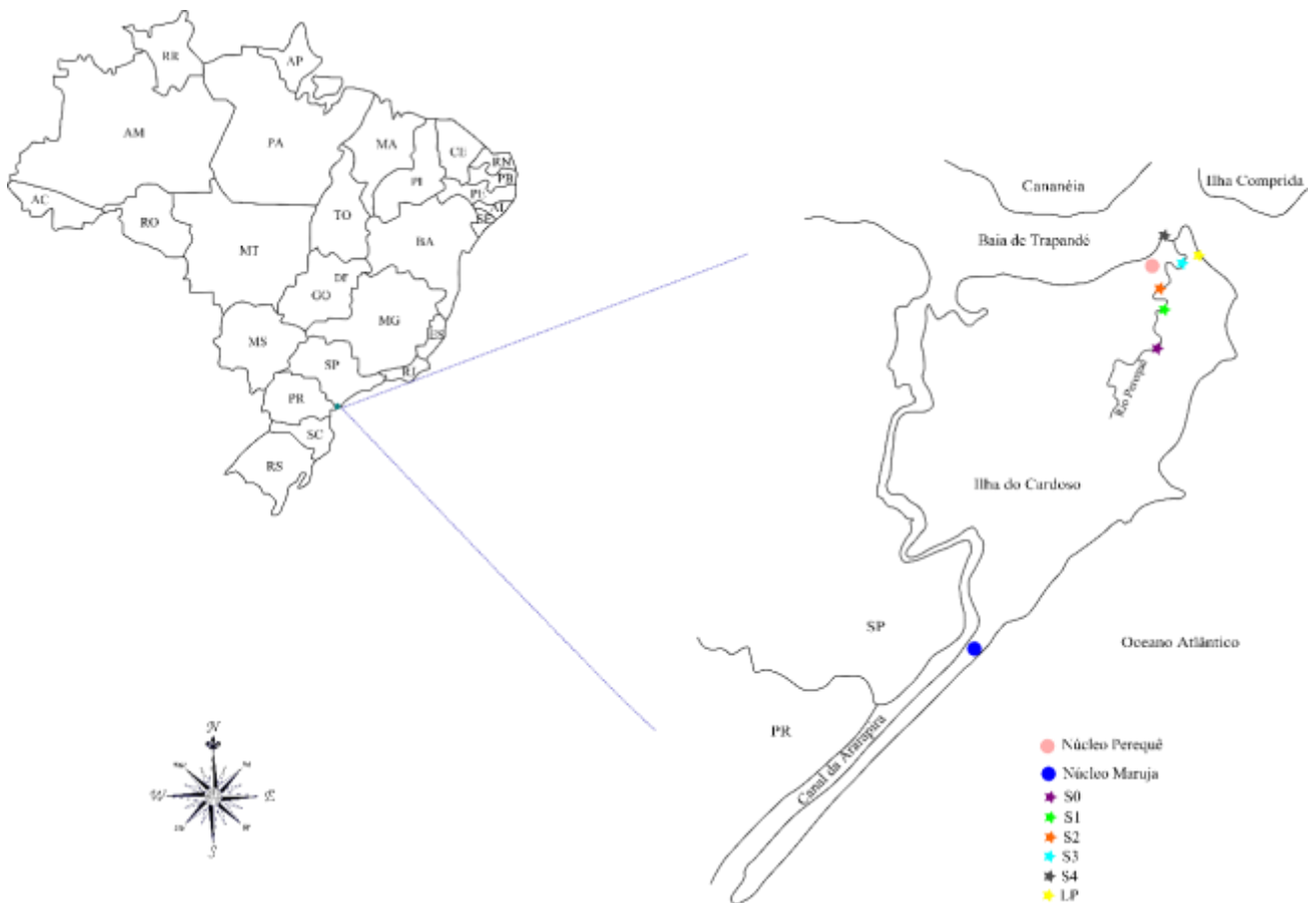
## 1.2. Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)

O Parque Estadual da Ilha do Cardoso - PEIC (25°03'05" -25°18'18" S; 47°53'48" - 48°05'42" W), administrado pelo Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, ocupa uma área de cerca de 22.500 ha no município de Cananéia, estado de São Paulo. A Ilha do Cardoso, com topologia bastante irregular, especialmente montanhosa, faz parte do complexo estuarino lagunar de Iguape-Cananéia-Paranaguá, com 600 km<sup>2</sup> de mangue, é considerada o terceiro estuário do mundo em relação à produtividade primária (Negreiros *et al.* 1974, Barros *et al.* 1991).

O manguezal da região classifica-se como Mangue Vermelho de Franja pela dominância das árvores de *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), que é seguida por *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (mangue branco) e *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke (mangue preto) (Souza *et al.* 2006). Estudos realizados demonstraram que há diferença na composição química das folhas entre as duas espécies dominantes, *R. mangle* e *L. racemosa*, mostrando que a porcentagem de nitrogênio é maior para *L. racemosa*, enquanto que as porcentagens de tanino e lignina são maiores para *R. mangle* (Oliveira 2009), diferenças estas que podem influenciar a colonização microbiana, já que os compostos secundários (taninos, fenóis, entre outros) têm reconhecida atividade antimicrobiana (Ashton *et al.* 1999; Kristensen *et al.* 2008) e as altas concentrações de nitrogênio e fósforo são indicadoras de maior valor nutricional para os decompositores (Silva *et al.* 2007, Oliveira 2009).

O clima da Ilha é classificado como megatérmico superúmido, sem estação seca definida, e com precipitação média anual de 3.000 mm (Barros *et al.* 1991, Bernardi *et al.* 2005). O sistema de drenagem local é do tipo radial, com rios que desaguam diretamente no mar, sendo um dos principais rios o Perequê (Barros *et al.* 1991), rio de grande extensão que corta o PEIC.

O núcleo Perequê, local de amostragem, agrega diferentes tipos de vegetação de Mata Atlântica, como vegetação de mangue, vegetação de restinga, vegetação pioneira de dunas, floresta tropical pluvial de planície litorânea e floresta pluvial da Serra do Mar (Barros *et al.* 1991); um centro de pesquisa científica e facilidade de acesso, características que foram importantes para delimitação como área de estudo (Figura 1).



**Figura 1.** Localização do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). Locais de coleta no Núcleo Perequê.

## 2. Coletas

Foram realizadas quatro coletas ao longo de um ano (Agosto e Novembro/2012 e Fevereiro e Junho/2013) em área de manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), com coletas, em triplicatas, de quantidades padronizadas de (i) água do manguezal (500 ml) e (ii) folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* (aprox. 400 g), em cinco locais com diferentes faixas de salinidade

ao longo do rio Perequê até o mar (S0: 0,05-0,1%, S1: 0,7-0,8%, S2: 1,35-1,62%, S3: 2,17-2,91% e S4: 2,62-3% de salinidade, mensurados no momento das coletas), e em uma lagoa (LP) próxima ao rio com teor salino flutuante (Figura 2). Cada réplica de folhedo foi colocada em uma sacola plástica e umedecida com água do local. Ambos os tipos de amostras (água e folhedo) foram transportadas ao laboratório numa caixa térmica para evitar a dessecação e aumento excessivo de temperatura.



**Figura 2.** Áreas de coleta ao longo do rio Perequê até o mar no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)

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

Para a caracterização abiótica da água foram mensurados, nos diferentes locais de coleta, a condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), o oxigênio dissolvido ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), o pH e a salinidade (%), por meio de equipamento U-10/U-51 Horiba.

### 4. Processamento das amostras

No laboratório, alíquotas da água coletada em cada salinidade (30 mL) foram colocadas em placas de Petri e iscadas com cinco sementes de *Sorghum* spp. (sorgo) e cinco discos (0,5 cm de diâm.) de epiderme de *Allium cepa* (cebola), sendo realizadas triplicadas com cada salinidade e tipo de isca.

As folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* foram cortadas com furador de rolha em discos de 0,5 cm diâm. e lavadas por cinco vezes com uma diluição de 50% água do mar para retirar o sedimento depositado. Cinco discos de cada espécie vegetal foram colocados em placas de Petri com diluições estéreis de água do mar filtrada e água destilada (30 mL), preparadas de acordo com a salinidade onde foram coletadas as folhas, e iscadas com as mesmas iscas utilizadas para as amostras de água. Os discos de cada espécie vegetal foram colocados também em meio de cultura sólido PYGs (1,25 g de peptona de carne, 1,25 g de extrato de levedura, 3 g de glicose, 12 g de ágar, 500 mL de água do mar filtrada e 500 mL de água destilada) e V8 (200 mL de V8, 3 g de  $\text{CaCO}_3$ , 12 g de ágar, 500 mL de água do mar filtrada e 500 mL de água destilada) com antibióticos 0,2 g penicilina G e 0,2 g sulfato de estreptomicina (Fuller & Jaworski 1987).

Após a incubação de 3-4 dias, as colônias que cresceram nas iscas foram observadas e as supostamente de oomicetos transferidas para novas placas e purificadas. Isolados que cresceram nos meios de cultura foram transferidos para placas de Petri com 50% de água do mar.

Os espécimes obtidos foram inicialmente identificados em nível de gênero e transferidos para meio de cultura para sua posterior identificação morfológica em nível de espécie, de acordo com os trabalhos de Sparrow (1960), Johnson & Sparrow (1961), Fell & Master (1975), Plaats-Niterink (1981), Ho & Jong (1990), Johnson *et al.* (2002) e Luz *et al.* (2008). O arranjo taxonômico utilizado foi de Beakes *et al.* (2014).

Os meios de cultura utilizados para o isolamento das espécies foram V8 e PYGs, preparados com água do mar filtrada em uma relação 50% água do mar e 50% de água destilada (para as espécies coletadas em água salobra e salina) e YpSs (5 g de amido solúvel, 0,25 g de extrato de levedura, 0,25 g de fosfato de potássio, 0,125 g de sulfato magnésio, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada), MP<sub>5</sub> (4 g de maltose, 1 g de peptona, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) e CMA (17 g de “cornmeal” ágar e 1.000 mL de água destilada) com a adição de antibióticos (penicilina e sulfato de estreptomicina) para as espécies coletadas em pontos de menor salinidade (Fuller & Jaworski 1987). Representantes das espécies identificadas foram incorporados ao acervo do Instituto de Botânica de São Paulo (Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias – CCIBt), pelo método de Castellani (Figueiredo & Pimentel 1975), em frascos Wheaton com água destilada e esterilizada (Milanez 1989) e em tubos de ensaio com meio de cultura específico inclinado (para os isolados em menor salinidade 0,05- 1%). Os isolados provenientes de salinidades superiores a 1%, foram preservados utilizando-se 50% água do mar e 50% de água destilada, pelos métodos acima citados.

## 5. Análise da comunidade de Oomycota presente nas amostras

Os táxons foram considerados em cada unidade amostral se estiveram presentes durante a incubação (4-30 dias) nos meios de cultura, nos discos de folhas analisados por observação direta ou nas iscas. Cada unidade amostral consistiu em uma placa de Petri com (i) cinco discos de folhas em meio de cultura, (ii) cinco discos de folhas com iscas (semente ou epiderme de cebola) ou (iii) água do manguezal com iscas (semente ou epiderme de cebola). A frequência e a abundância foram calculadas de acordo com Marano & Steciow (2006), Marano *et al.* (2008, 2011a, b, c) e Nascimento *et al.* (2011). Assim foram calculadas a Frequência (F%): (número de unidades amostrais positivas para um táxon/ número de unidades amostrais examinadas) × 100, onde cada mês foi considerado uma unidade amostral; Abundância (A%): (número de iscas ou discos de folhas colonizados por um táxon/ número de amostras coletadas) × 100, onde cada placa foi considerada uma unidade amostral. Todos os dados foram transformados em LN (x+1).

A estrutura da comunidade foi analisada mediante o cálculo de: (i) riqueza de espécies (S); (ii) índice de diversidade de Shannon  $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \cdot \log_2(p_i)$ , onde  $p_i$  é a abundância da espécie  $i$ , que contribui para a diversidade total; e (iii) equitabilidade  $E = H'/H'_{\max}$ , onde  $H'_{\max}$  é o máximo valor de diversidade possível para o total de espécies presentes (Magurran, 1988); (iv) índice de dominância de Simpson  $D = 1/\sum_{i=1}^S (p_i)^2$ . Para avaliar a significância dos índices de diversidade ( $H'$ ) foi utilizado o “H-t test” (Thomas & Clay 2005).

A comparação da abundância e composição de espécies nas folhas, nas diferentes salinidades e coletas foi realizada mediante teste de comparação de médias múltiplas Kruskal-Wallis, sendo as diferenças avaliadas mediante um teste a posteriori Mann-Whitney (com correção de Bonferroni). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Todos os testes foram realizados no programa Past (Paleontological Statistic, disponibilizado em <http://folk.uio.no/ohammer/past>, acesso em 5 de janeiro de 2013).

## 6. Análise molecular

### 6.1. Produção de biomassa

Para a produção de biomassa foi utilizada a metodologia de microcultivo descrita por Lamour & Finley (2006); porém, foram realizadas etapas manuais ao invés de automatizadas e utilizados microtubos ao invés de microplacas. Os isolados foram cultivados inicialmente em meio sólido, depois retirados fragmentos de meio de cultura sólido contendo micélio para a inoculação em três microtubos Eppendorf® (1,5-2,0 mL) contendo 1 mL de meio de cultura líquido esterilizado (MP5 para os isolados obtidos na salinidade S0 e PYGs para os demais isolados). Os microtubos foram incubados a 21 °C durante 7 dias de modo estacionário. Os isolados que não produziram biomassa em microcultivo foram cultivados em Erlenmeyers de 250 mL (três réplicas) contendo 50mL de meio líquido (MP5 ou PYGs), incubados nas mesmas condições que no microcultivo, sendo que estes procedimentos foram repetidos, quando necessário, até obtenção de biomassa suficiente para extração

de DNA. Após o crescimento, a biomassa produzida foi transferida para microtubos de Eppendorf® para início das etapas de extração de DNA.

### 6.2. Extração de DNA

As biomassas produzidas em triplicatas após o crescimento, foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos para separar a biomassa do meio de cultura que foi extraído com o auxílio de uma pipeta automática, e concentrado a biomassa em um dos microtubos. Duas lavagens foram realizadas adicionando 1mL de água destilada esterilizada e centrifugados a 13000 rpm por sete minutos. Após as lavagens, a água foi descartada e a biomassa utilizada para a extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada com o “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen™). A eficiência da extração foi avaliada após eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA genômico foi armazenado em freezer (-20) para as etapas posteriores.

### 6.3. Amplificação e purificação do DNA

Foram amplificadas as regiões LSU, ITS total, SSU do rDNA e COX I do mDNA utilizando os seguintes “primers”: (i) LSU: LROR e LR6-O; (ii) ITS: ITS4 e ITS6 ou UN-up 18S42 e UN-up 28S22; (iii) SSU: SR1-R e NS4 e (iv) COX I: OomCoxI-Levup e OomCoxI-Levlo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o “PCR Supermix Kit” (Invitrogen™) e o “Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich®) para o volume final de 25 µL em microtubos de 200 µL. Os microtubos foram incubados em um termociclador “C1000 Touch™ Thermal Cycler” (Bio-Rad) utilizando para as regiões LSU, ITS e SSU o ciclo descrito por Marano *et al.* (2014a) e para o COX I utilizado o ciclo descrito por Robideau *et al.* (2011). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o “AxyPrep PCR Clean-up Kit” utilizando-se 30 µL de tampão eluente e finalmente armazenado em congelador a -20°C.

### 6.4. Sequenciamento

As amostras amplificadas e purificadas foram sequenciadas em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™) instalado no CEGH-USP (Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, USP). Para cada reação do sequenciamento foi enviado um microtubo de



200µL contendo 5µL de DNA na concentração de 25-30ng/µL e 2,5 µL de cada primer na concentração de 5µM.

#### 6.5. Tratamento das sequências

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

#### 6.6. Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta de busca “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn), e também com as sequências obtidas para os isolados de *Halophytophthora* e *Salisapilia* importadas do “CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre”, Utrecht, Holanda. O critério considerado para a confirmação da identificação das espécies na base molecular foi de 99-100% de identidade máxima, obtida após análise no BLASTn, se em concordância com os dados morfológicos. Os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados no programa online MAFFT versão 7 (Kazutaka & Daron 2013) e a correção do alinhamento e eliminação de regiões ambíguas editadas no programa Geneious (versão 8.0.5). Os modelos de substituições e as árvores filogenéticas pelo método de máxima verossimilhança foram realizadas no programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

### 7. Testes de Salinidade

Para caracterização do crescimento da colônia, das espécies consideradas novas para a ciência e primeiras citações para o Brasil, em gradientes de salinidade, foi utilizada a metodologia descrita por Nakagiri (1993, modificado). Foram testados os meios de cultura sólido PYG, V8, MP<sub>5</sub> e CMA, preparados nas seguintes concentrações: salinidade de 0 (sem água do mar); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% (somente água do mar). As triplicatas foram incubadas a 21 °C (culturas de *Halophytophthora* e *Phytophthora* isolados em salinidade superior a 1%) e a 23 °C (culturas de outros gêneros obtidos em

salinidade menor que 1%) durante até 96 h e os diâmetros das colônias mensurados com uma régua milimétrica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Caracterização dos fatores abióticos

Os dados relativos aos fatores abióticos mensurados nos locais de coleta durante o período de estudo constam na tabela 1. Os valores de temperatura variaram conforme as estações do ano, sendo o valor mais baixo de 18° C obtido em junho/2013 e o mais alto de 28° C em fevereiro/2013. O pH apresentou pouca variação se mantendo de ácido (6,3) a básico (8,1) durante todo o período. Os valores de condutividade variaram de acordo com a salinidade, apresentando o valor mais baixo (1,2 a 2,6  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) em menor salinidade (0,05%) e o mais alto (38,9 a 46,2  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) em maior salinidade (3%). O oxigênio dissolvido variou pouco, apresentando boa oxigenação da água, com exceção da lagoa em Agosto/2012 (3,1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A lagoa foi o único local de coleta mais instável, tendo apresentado também as maiores variações de salinidade, já que se tratou do único ponto fixo durante as coletas.

**Tabela 1.** Fatores abióticos mensurados em área de manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP, de Agosto/2012 a Junho/2013. Os locais de coleta ao longo do rio Perequê até o mar estão indicados como S0 a S4 e o da lagoa como L. OD = oxigênio dissolvido. sd\*- sem dado, devido a problemas no sensor do equipamento Horiba U-10.

Fatores/Coletas	1ª Coleta (Agosto/2012)						2ª Coleta (Novembro/2012)						3ª Coleta (Fevereiro/2013)						4ª Coleta (Junho/2013)					
	S0	S1	S2	S3	S4	L	S0	S1	S2	S3	S4	L	S0	S1	S2	S3	S4	L	S0	S1	S2	S3	S4	L
Temperatura (°C)	19	20	21	21	22	19	25	27	27	27	27	24	24	26	27	28	28	26	19	20	22	22	22	18
pH	6,6	7,2	7,1	7,8	7,9	6,8	6,9	6,9	7,4	7,8	8	6,7	6,3	6,3	6,6	7,5	7,7	5,8	6,5	6,9	7,8	8,1	8,1	6,8
Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	1,2	12,6	26,5	44,9	46,2	37,9	2,6	13,6	26,8	34,5	41,9	21,7	1,25	13,4	22,5	39,4	38,9	17,9	1,2	14	28,5	41,1	42,8	9,6
OD ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	6,5	6,5	5,9	6,9	8,3	3,1	sd	sd	sd	sd	sd	sd	10,2	9	5,9	6,5	7,9	9	6,9	5,6	6,8	6,6	6,8	6,2
Salinidade (%)	0,05	0,72	1,62	2,91	3	2,5	0,1	0,79	1,67	2,17	2,72	1,35	0,06	0,78	1,35	2,46	2,62	1,04	0,06	0,81	1,75	2,62	2,75	0,54

## 2. Análise da Diversidade

Foram analisadas 571 amostras, das quais foram obtidos 146 isolados, 111 pertencentes ao gênero *Halophytophthora* e 35 pertencentes aos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Phytophthora*, *Phytopythium* e *Pythium*. Destes isolados, 50 estão preservados em cultura pura, sendo 27 isolados de *Halophytophthora* e 23 pertencentes aos outros gêneros (*Achlya*: quatro isolados, *Aphanomyces*: um isolado, *Phytophthora*: cinco isolados, *Phytopythium*: quatro isolados e *Pythium*: nove isolados), como consta nas tabelas 2, 3 e 4. Dezesete táxons foram identificados em nível específico, dentre eles, seis espécies pertencentes ao gênero *Halophytophthora*. Todas as espécies pertencentes ao gênero *Halophytophthora*, *Phytopythium kandeliae* e *Pythium grandisporangium* são reportadas pela primeira vez no Brasil. Destes táxons, seis são novas citações para a ciência, três pertencentes ao gênero *Halophytophthora*, duas pertencentes ao gênero *Phytophthora* e uma pertencente ao gênero *Achlya*. Todas as espécies de Oomycota são primeiras citações para o PEIC.

### REINO STRAMINIPILA

#### FILO OOMYCOTA

##### PERONOSPORALES

##### PERONOSPORACEAE

##### Gênero *Halophytophthora* H.H. Ho & S.C. Jong

*Halophytophthora avicennae* (Gerretton-Cornell & J.A. Simpson) H.H. Ho & S.C. Jong, Mycotaxon 36 (2): 381, 1990.

Basiônimo: *Phytophthora avicenniae* Gerretton-Cornell & J.A. Simpson, Mycotaxon 19: 453, 1984.

Figura 3A-F

Cultura em PYG petalóide com micélio aéreo escasso ou ausente. Micélio pouco desenvolvido em semente de *Sorghum* sp, hialino, ramificado, pouco septado. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas vegetativas, longos, ramificação simpodial, com a formação de zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios abundantes, alguns operculados, raramente intercalares, limoniformes, ovóides,

**Tabela 2.** Oomicetos isolados de amostras de água de uma área de manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), São Paulo, SP, nos diferentes meses de amostragem. Os locais de coleta ao longo do rio Perequê até o mar estão indicados como S0 a S4 e o da lagoa como L.P. T= Total. F = Frequência. A= Abundância.

Táxons/Coletas	1ª Coleta (Ago/2012)						2ª Coleta (Nov/2012)						3ª Coleta (Fev/2013)						4ª Coleta (Jun/2013)						T	F (%)	A (%)							
	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.										
REINO STRAMINIPILA																																		
FILO OOMYCOTA																																		
PERONOSPORALES																																		
PERONOSPORACEAE																																		
<i>Halophytophthora</i> spp.	-	4	14	7	3	28	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58	75	9,72
<i>Phytophthora</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	25	1,39
<i>Phytophythium kandeliae</i> Thines	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39	
PYTHIACEAE																																		
<i>Pythium</i> aff. <i>dissotocum</i> Drechsler	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39	
<i>P. grandisporangium</i> Fell & Master	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	50	2,78	
<i>Pythium</i> spp.	4	12	1	-	-	-	3	2	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	75	8,33	
SAPROLEGNIALES																																		
ACHLYACEAE																																		
<i>Achlya catenulata</i> sp. nov.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39	
<i>A. klebsiana</i> Pieters	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39	
<i>Achlya</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39	
<i>Achlya</i> spp.	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	50	2,78	
<i>Dictyuchus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	25	1,39	
VERRUCALVACEAE																																		
<i>Aphanomyces laevis</i> de Bary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	25	1,39	
Total de isolados	9	20	15	7	3	28	4	2	-	2	-	-	36	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	127			
Total de táxons																										12								

**Tabela 3.** Oomicetos isolados de amostras de folhas de *Rhizophora mangle* de uma área de manguezal do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), São Paulo, SP, nos diferentes meses de amostragem. Os locais de coleta ao longo do rio Perequê até o mar estão indicados como S0 a S4 e o da lagoa como L. P. T= Total. F = Frequência. A= Abundância.

Táxons/Coletas	1ª Coleta (Ago/2012)						2ª Coleta (Nov/2012)						3ª Coleta (Fev/2013)						4ª Coleta (Jun/2013)						T	F (%)	A (%)	
	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.	S0	S1	S2	S3	S4	L.P.				
REINO STRAMINIPILA																												
FILO OOMYCOTA																												
PERONOSPORALES																												
PERONOSPORACEAE																												
<i>Halophytophthora avicennae</i> (Gerretton-Cornell & J.A. Simpson) H.H. Ho & S.C. Jong	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39
<i>H. polymorphica</i> (Gerretton-Cornell & J.A. Simpson) H.H. Ho & S.C. Jong	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39
<i>H. spinosa</i> var. nov.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	7	2	3	3	-	-	-	1	1	-	-	-	-	21	75	11,11
<i>H. vesicula</i> (Anastasiou & Churchl.) H.H. Ho & S.C. Jong	-	-	1	-	2	2	-	-	1	1	2	-	-	1	1	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	15	100	15,28
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	50	1,39
<i>Halophytophthora</i> spp.	1	-	3	9	5	3	-	-	4	6	2	2	-	5	6	7	6	4	-	-	6	12	3	-	84	100	23,61	
<i>Phytophthora</i> sp.	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	25	2,78
<i>Phytophthora</i> sp. nov. 1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	25	1,39
<i>Phytophthora</i> sp. nov. 2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39
PYTHIACEAE																												
<i>Pythium grandisporangium</i> Fell & Master	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	25	4,17
<i>Pythium</i> spp.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	50	4,17
SAPROLEGNIALES																												
ACHLYACEAE																												
<i>Achlya aff. flagellata</i> Coker	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39
<i>Dictyuchus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1,39
Total de isolados	4	5	5	10	7	9	1	-	5	9	6	2	3	13	9	13	10	4	-	-	7	14	3	-	139			
Total de táxons																										13		



irregulares e obpiriformes, 55-105 × 30-52,5 µm (média 79,5 × 40,7 µm); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug basal do zoosporângio presente, 2,5-7,5 µm diâm. (média 5,7 µm diâm.). Zoósporos formados dentro dos zoosporângios e liberados por meio de uma vesícula globosa ou longa que desaparece completamente até uma hora após a liberação, 37,5-115 × 15-32,5 µm (média 83,7 × 24,3 µm); zoósporos encistados, 7,5-11,2 µm diâm. (média 9,2 µm diâm.). Clamidósporos e estruturas sexuais ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado a partir de amostras de folhas de *Rhizophora mangle*, 30-VIII-2012, em salinidade de 0,8 %, e mantido em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.*

O espécime apresentou zoosporângios maiores que os descritos por Gerretton-Cornell & Simpson (1984), os quais relatam de 44-121 × 18-44 µm (média 75 × 31 µm), e não apresentou hifas coralóides, como mencionadas na descrição original. No entanto, foi verificada a presença de zoosporângios operculados, ainda não relatados para a espécie. *Halophytophthora avicennae* foi descrita pela primeira vez como *Phytophthora avicennae* por Gerretton-Cornell & Simpson (1984), isolada a partir de folhas de *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. na Austrália.

***Halophytophthora polymorphica*** (Gerretton-Cornell & J.A. Simpson) H.H. Ho & S.C. Jong, Mycotaxon 36 (2): 381, 1990.

Basiônimo: *Phytophthora polymorphica* Gerretton-Cornell & J.A. Simpson, Mycotaxon 19: 462, 1984.

Figura 4 A-F

Cultura em PYG petalóide com micélio aéreo escasso ou ausente. Micélio pouco desenvolvido em semente de *Sorghum* sp, hialino, ramificado, pouco septado. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas vegetativas, longos, ramificação simples, raramente simpodial, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios abundantes, alguns operculados, limoniformes, ovóides, globosos, elipsoidais, irregulares e obpiriformes, 100-200 × 30-57,5 µm (média 108,9 × 58,6 µm), alguns apresentando dois poros de liberação (somente um deles se rompe durante a liberação dos zoósporos)

e projeção hifal; parede rugosa após liberação dos zoósporos. Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug basal do zoosporângio presente, 2,5-6,2  $\mu\text{m}$  (média 4,5  $\mu\text{m}$ ). Zoósporos formados dentro dos zoosporângios e liberados por meio de uma vesícula globosa ou longa, a qual desaparece completamente até duas horas após a liberação, 40-127,5  $\times$  17,5-35  $\mu\text{m}$  (média 69,8  $\times$  28,6  $\mu\text{m}$ ); zoósporos encistados, 7,5-15  $\mu\text{m}$  diâm. (média 10  $\mu\text{m}$  diâm.). Clamidósporos e estruturas sexuais ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado a partir de amostras de folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, 30-VIII-2012, em salinidade de 2,8 a 3 % e mantidos em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4111, CCIBt 4112).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h a 21 °C: Isolado AJM 33 (CCIBt 4112): em PYG sem sal: 2,6 cm, em PYG com 0,5% de sal: 4,0 cm, em PYG com 1% de sal: 4,5 cm, em PYG com 1,5% de sal: 5,0 cm, em PYG com 2% de sal: 5,6 cm, em PYG com 2,5% de sal: 5,7 cm, em PYG com 3% de sal: 5,8 cm.

Os espécimes apresentaram zoosporângios maiores que os descritos por Gerretton-Cornell & Simpson (1984), que citaram de 44-102  $\times$  33-84  $\mu\text{m}$  (média 72  $\times$  58,6  $\mu\text{m}$ ), e zoosporângios operculados ainda não descrito para a espécie. O espécime foi comparado com o exemplar tipo (CBS 680.84) e não apresentou diferenças morfológicas, o qual também apresentou presença de opérculo. *Halophytophthora polymorphica* foi descrita pela primeira vez como *Phytophthora polymorphica* por Gerretton-Cornell & Simpson (1984), isolada a partir de folhas de *Eucalyptus* sp. na Austrália.

***Halophytophthora vesicula*** (Anastasiou & Churchl.) H.H. Ho & S.C. Jong, Mycotaxon 36 (2): 380, 1990.

Basiônimo: *Phytophthora vesicula* Anastasiou & Churchl., Canadian Journal of Botany 47 (2): 252, 1969.

Figuras 5-6A-F

Cultura em PYG petalóide. Micélio pouco desenvolvido em semente de *Sorghum* sp, hialino, ramificado, pouco septado. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas vegetativas, longos,



ramificação simpodial, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios abundantes, operculados, ovóides, obclavados, irregulares e obpiriformes,  $72,5-275 \times 32,5-35 \mu\text{m}$  (média  $92 \times 45,3 \mu\text{m}$ ); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug basal do zoosporângio presente,  $2,5-10 \mu\text{m}$  diâm. (média  $4,7 \mu\text{m}$  diâm.). Zoósporos formados dentro dos zoosporângios e liberados por meio de uma vesícula globosa ou longa que desaparece completamente até uma hora após a liberação,  $30-82,5 \times 15-25 \mu\text{m}$  (média  $48,9 \times 18,6 \mu\text{m}$ ); zoósporos encistados,  $7,5-12,5 \mu\text{m}$  diâm. (média  $10 \mu\text{m}$  diâm.). Clamidósporos e estruturas sexuais ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado a partir de amostras de água, folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, 30-VIII-2012, 07/XI/2012, 27/II/2013 e 04/VI/2013 em salinidade de 0,8 a 3 %, e mantidos em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4109, 4110).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h a 21 °C: Isolado AJM 1 (CCIBt 4109): em PYG sem sal: 1,8 cm, em PYG com 0,5% de sal: 2,5 cm, em PYG com 1% de sal: 2,9 cm, em PYG com 1,5% de sal: 3,4 cm, em PYG com 2% de sal: 3,5 cm, em PYG com 2,5% de sal: 3,4 cm, em PYG com 3% de sal: 2,6 cm.

Os espécimes apresentaram zoosporângios com bastante plasticidade morfológica. Os zoosporângios observados são maiores que os descritos por Anastasiou & Churchland (1969) que citam de  $47-192 \times 24-100 \mu\text{m}$ . Os isolados foram comparados com o exemplar CBS 393.81, depositado por C.J. Anastasiou em julho de 1981 e não apresentaram diferenças morfológicas, porém foram visualizados opérculos, estrutura originalmente não descrita para a espécie. *Halophytophthora vesicula* foi descrita pela primeira vez como *Phytophthora vesicula* por Anastasiou & Churchland (1969), isolada a partir de folhas de *Prunus laurocerasus* Linnaeus no Canadá.

***Halophytophthora spinosa* var. nov.**

Figura 7A-F

Cultura em PYG petalóide, micélio sem desenvolvimento em semente de *Sorghum* sp., hialino, ramificado, pouco septado. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas vegetativas, longos, ramificação simples, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios lisos ou ornamentados, abundantes, alongados, esféricos e obpiriformes, 35-150 × 25-150 µm (média 85,6 × 61,79 µm); ornamentação espinhosa, 7,5-35 µm compr. (média 16,9 µm compr.) presentes na maioria dos zoosporângios; parede espessa. Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug basal do zoosporângio presente, 2,5-7,5 µm diâm. (média 5,5 µm diâm.). Liberação dos zoósporos por meio de um tubo persistente, longo ou curto, 15-30 × 12,5-15 (média 22,75 × 14,5). Vesícula zoosporangial ausente. Zoósporos encistados, 6,25-12,5 µm diâm. (média 9 µm diâm.). Clamidósporos e estruturas sexuais ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolados a partir de amostras de folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, 08/XI/2012, 27/II/2013, 05/VI/2013 em salinidade de 0,8 a 3 %, e mantidos em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4115).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h a 21 °C: Isolado AJM 98 (CCIBt 4115): em PYG sem sal: 1,1 cm, em PYG com 0,5% de sal: 2,0 cm, em PYG com 1% de sal: 3,0 cm, em PYG com 1,5% de sal: 5,4 cm, em PYG com 2% de sal: 5,6 cm, em PYG com 2,5% de sal: 6,3 cm, em PYG com 3% de sal: 5,5 cm.

Os espécimes descritos apresentam características morfológicas comuns entre as duas variedades de *Halophytophthora spinosa* (*H. spinosa* var. *spinosa*, *H. spinosa* var. *lobata*) Fell & Master (1975). A forma dos zoosporângios é mais semelhante a variedade *spinosa*, mas a forma da colônia no meio de cultura é petalóide, sendo então mais semelhante a variedade *lobata*. Os espécimes apresentaram também zoosporângios e ornamentações em forma de espinhos, maiores que os descritos para ambas as variedades. *Halophytophthora spinosa* var. *spinosa* Fell & Master (1975) foi

isolada de folhas de *Rhizophora mangle* em Miami na Flórida e *Halophytophthora spinosa* var. *lobata* Fell & Master 1975 foi isolada de folhas de *Rhizophora* sp. em Rung Sat no Vietnã. Os isolados foram comparados com os exemplares tipos depositados na CBS (588.85 e 591.85) pelos autores em 1972 e apresentaram não apenas diferenças morfológicas como também moleculares (regiões SSU e LSU do rDNA), justificando o estabelecimento de uma nova variedade para a espécie (Figuras 21 e 22).

### ***Halophytophthora* sp. nov. 1**

Figura 8A-F

Cultura em PYG petalóide. Micélio pouco desenvolvido em semente de *Sorghum* sp., hialino, ramificado, pouco septado. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas vegetativas, longos, ramificação simples e simpodial, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios abundantes, operculados, irregulares, limoniformes, ovóides e obpiriformes, 52,5-162,5 × 37,5-77,5 µm (média 93,54 × 56,51 µm); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug basal do zoosporângio presente, 1,25-5 µm diâm. (média 3,6 µm diâm.). Zoósporos formados dentro dos zoosporângios e liberados por meio de uma vesícula longa que desaparece completamente até uma hora após a liberação, 62,5-175 × 20-35 µm (média 119,9 × 28 µm) µm; zoósporos encistados, 8,7-12,5 µm diâm. (média 10,2 µm diâm.). Oogônios lisos, globosos, 25-45 µm diâm. (média 38,6 µm diâm.). Anterídios díclinos, anfígenos. Oósporos pleróticos, hialinos a amarelados, globosos, 25-45 µm diâm. (média 38,3 µm diâm.), 1 por oogônio; parede lisa, 2,5-5 µm de espessura. (média 3µm de espessura). Clamidósporos ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolados a partir de amostras de água, folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, 30-VIII-2012 e 27/II/2013 em salinidade de 0,8 a 2,8%, e mantidos em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4113).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h a 21 °C: Isolado AJM 46 (CCIBt 4113): em PYG sem sal: 1,3 cm, em PYG com 0,5% de sal: 1,9

cm, em PYG com 1% de sal: 2,3 cm, em PYG com 1,5% de sal: 2,8 cm, em PYG com 2% de sal: 2,7 cm, em PYG com 2,5% de sal: 3,1 cm, em PYG com 3% de sal: 3,5 cm.

Os zoosporângios apresentam características semelhantes a outras espécies do gênero, porém estruturas sexuais distintas, como a presença exclusiva de anterídios anfígenos. Este tipo de anterídio foi relatado pela primeira vez para *Halophytophthora fluviatilis* Yang & Hong (2014), tendo sido observada a presença de anterídios paráginos, raramente anfígenos. É a segunda citação da presença de anterídio anfígeno para o gênero.

### ***Halophytophthora* sp. nov. 2**

Figura 9A-F

Cultura em PYG petalóide. Micélio pouco desenvolvido em semente de *Sorghum* sp, hialino, ramificado, pouco septado. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas vegetativas, longos, ramificação simples ou simpodial, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios abundantes, operculados, ovóides, obclavados, irregulares e obpiriformes, 38,9-105,3 × 28,2-80,9 µm (média 71,1 × 51,6 µm); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug basal do zoosporângio presente, 2,5-10 µm diâm. (média 5,3 µm diâm.). Zoósporos formados dentro dos zoosporângios e liberados por meio de uma vesícula globosa ou longa que desaparece completamente até uma hora após a liberação, 55-110 × 20-42,5 µm (média 77,8 × 28,4 µm) µm; zoósporos encistados, 10-12,5 µm diâm. (média 11,2 µm diâm). Clamidósporos e estruturas sexuais ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolados a partir de amostras de água, folhas de *Laguncularia racemosa* 07/XI/2012 em salinidade de 1,6 a 2.8%, e mantidos em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4114).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h a 21 °C: Isolado AJM 76 (CCIBt 4114): em PYG sem sal: 2,2 cm, em PYG com 0,5% de sal: 2,7

cm, em PYG com 1% de sal: 2,7 cm, em PYG com 1,5% de sal: 3,6 cm, em PYG com 2% de sal: 3,5 cm, em PYG com 2,5% de sal: 3,5 cm, em PYG com 3% de sal: 3,7 cm.

Embora as características morfológicas apresentadas pelos espécimes isolados sejam comuns entre as outras espécies do gênero *Halophytophthora*, análises moleculares das regiões SSU, ITS e LSU apontam como uma espécie nova para a ciência (Figuras 21, 22 e 23).

### **Gênero *Phytophthora* de Bary**

#### ***Phytophthora* sp.**

Figura 10A-F

Micélio bem desenvolvido, hialino, ramificado, não septado. Dilatações hifálicas presentes. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas, longos, ramificação simples, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios com proliferação interna. Zoosporângios ovóides a obpiriformes, 36-80 × 26-60 μm (média 58 × 39 μm); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Plug basal do zoosporângio presente. Zoósporos formados dentro dos zoosporângios e liberado por meio de uma vesícula globosa. Estruturas sexuais e clamidósporos ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolados a partir de amostras de folhas de *Rhizophora mangle*, 30-VIII-2012, em salinidade de 2,8 %, e mantidas em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4120).

Os isolados não apresentaram as características morfológicas essenciais para a identificação em nível de espécie. Nas análises moleculares de máxima verossimilhança das regiões SSU, ITS e LSU do rDNA, os isolados estão bem suportados no clado 6, entre as espécies *Phytophthora humicola* Ko & Ann e *P. inundata* Brasier, Sánch. Hern. & S.A. Kirk.

***Phytophthora* sp. nov. 1**

## Figura 11A-F

Micélio bem desenvolvido, hialino, ramificado, não septado. Dilatações hifálicas presentes. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas, longos, ramificação simples, formando zoosporângios no ápice das hifas. Zoosporângios com proliferação interna. Zoosporângios ovóides a obpiriformes, 30-50 × 20-40 µm (média 37 × 28 µm); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Plug basal do zoosporângio presente. Zoósporos formados dentro do zoosporângio e liberado por uma vesícula globosa. Estruturas sexuais e clamidósporos ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolados a partir de amostras de folhas de *Rhizophora mangle*, 30-VIII-2012, em salinidade de 0,8 %, e mantidas em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4121).

Após purificados em meio de cultura, os isolados reduziram drasticamente o número de zoosporângios produzidos. Análises moleculares de máxima verossimilhança das regiões SSU, ITS e LSU do rDNA apontam o isolado como uma espécie nova de *Phytophthora* para a ciência (Figuras 22 e 24).

***Phytophthora* sp. nov. 2**

## Figura 12A-F

Micélio bem desenvolvido, hialino, ramificado, não septado. Dilatações hifálicas presentes. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas, longos, ramificação simples e simpodial, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios com proliferação interna. Zoosporângios ovóides a obpiriformes, 27,5-70 × 20-47,5 µm (média 37,3 × 32 µm); parede rugosa após liberação dos zoósporos. Plug basal do zoosporângio presente. Zoósporos formados dentro do zoosporângio e liberados por meio de uma vesícula longa; zoósporos encistados, 7,5-10 µm diâm. Estruturas sexuais e clamidósporos ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolada a partir de amostras de folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, 30-VIII-2012 e 27/II/2013 em salinidade de 1,6 e 2.8 %, e mantidas em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4116).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h a 21 °C: Isolado AJM 32 (CCIBt 4116): em PYG sem sal: 3,3 cm, em PYG com 0,5% de sal: 3,7 cm, em PYG com 1% de sal: 3,9 cm, em PYG com 1,5% de sal: 4,4 cm, em PYG com 2% de sal: 3,9 cm, em PYG com 2,5% de sal: 3,6 cm, em PYG com 3% de sal: 3,2 cm.

Os isolados apresentaram proliferação interna dos zoosporângios, normalmente encontrada nas espécies do gênero *Phytophthora*. Apresentaram também vesícula persistente, a qual diminuiu em comprimento e largura, mas não retraiu completamente, característica de *Halophytophthora porrigovesica*, nunca mencionada para representantes do gênero *Phytophthora*. Os isolados em meio de cultura produziram poucos zoosporângios, motivo pelo qual não foi possível mensurar o tamanho dos zoósporos. Análises moleculares de máxima verossimilhança das regiões SSU, ITS e LSU do rDNA, apontam os isolados como uma espécie nova de *Phytophthora* para a ciência (Figuras 21, 22 e 24).

**Gênero *Phytopythium*** Abad, de Cock, Bala, Robideau, A.M. Lodhi & Lévesque

***Phytopythium kandeliae*** (H.H. Ho, H.S. Chang & S.Y. Hsieh) Thines, European Journal of Plant Pathology 138: 435, 2014.

Basiônimo: *Halophytophthora kandeliae* H.H. Ho, H.S. Chang & S.Y. Hsieh. Mycologia, 83: 419, 1991.

Sinônimo: *Phytopythium kandeliae* (H.H. Ho, H.S. Chang & S.Y. Hsieh) A.V. Marano, A. L. Jesus & C. L. A. Pires-Zottarelli, Mycosphere 5 (4): 518, 2014.

Figura 13A-F

Micélio bem desenvolvido, hialino, ramificado, não septado. Dilatações hifálicas ausentes. Zoosporangióforos indiferenciados das hifas, longos, ramificação simpodial, formando zoosporângio no ápice das hifas. Zoosporângios ovóides a obovatos, semipapilados,  $22,5-60 \times 17,5-45 \mu\text{m}$  (média  $38,7 \times 29,7 \mu\text{m}$ ). Proliferação interna dos zoosporângios ausente. Plug do zoosporângio basal presente, formação do segundo plug frequentemente após a liberação dos zoósporos. Liberação do protoplasma zoosporangial ocorrendo parcialmente dentro de uma vesícula evanescente, ovóide,  $15-35 \times 17-45 \mu\text{m}$  (média  $24,5 \times 28,3 \mu\text{m}$ ); maturação dos zoósporos ocorrendo dentro da vesícula e do zoosporângio ao mesmo tempo. Zoósporos encistados,  $6,2-10 \mu\text{m}$  diâm. (média  $7 \mu\text{m}$  diâm). Estruturas sexuais ausentes.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado a partir de amostras de água e folhas de *Laguncularia racemosa*, 30-VIII-2012, 07-XI-2012 em salinidade de 0,05 a 0,8 %, e mantidas em meio de cultura PYGs, A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4023, CCIBt 4024, CCIBt 4025).

Crescimento da cultura: colônia petalóide, micélio aéreo escasso. Crescimento dos isolados após 96 h em 21 °C: Isolado AJM 26 (CCIBt 4023): em PYG sem sal: 1,3 cm, em PYG com 1,5% de sal: 2,4 cm, em V8 com 1,5% de sal: 2,7 cm, em CMA sem sal: 2,8 cm; Isolado AJM 85 (CCIBt 4024): em PYG sem sal: 1,1 cm, em PYG com 1,5% de sal: 1,8 cm, em V8 com 1,5% de sal: 2 cm, em CMA sem sal: 2,7 cm; Isolado AJM 95 (CCIBt 4025): em PYG sem sal: 1,2 cm, em PYG com 1,5% de sal: 2,6 cm, em V8 com 1,5% de sal: 3 cm, em CMA sem sal: 2,9 cm.

As características dos isolados estão de acordo com a descrição original da espécie (Ho, Chang & Hsieh 1991), a qual foi isolada de folhas de *Kandelia candel* (L.) em Taiwan. No entanto, os isolados apresentaram um tipo de maturação dos zoósporos única, ainda não descrita para o gênero *Phytopythium*, onde a maturação dos zoósporos ocorre na vesícula e no zoosporângio ao mesmo tempo (uma mistura de liberação tipo *Pythium-Phytophthora*). Esta característica é única no gênero, para o qual foi descrito apenas liberação tipo *Pythium* (Marano *et al.* 2014b). Os espécimes foram isolados em sementes de *Sorghum* sp. e posteriormente mantido em meio de cultura PYG 50%.



*Phytopythium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque Persoonia 34: 37, 2014.

Basiônimo: *Pythium vexans* de Bary, Journal of the Royal Agricultural Society of England 12: 255, 1876.

Sinônimos: *Ovatisporangium vexans* (de Bary) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360, 2010.

*Pythium complectens* M. Braun, Journal of Agricultural Research 29: 415, 1924.

*Pythium allantocladon* Sideris, Mycologia 24 (1): 27, 1932.

*Pythium ascophallon* Sideris, Mycologia 24 (1): 29, 1932.

*Pythium polycladon* Sideris, Mycologia 24 (1): 32, 1932.

*Pythium euthyhyphon* Sideris, Mycologia 24 (1): 34, 1932.

*Pythium piperinum* Dastur, Proceedings of the Indian Academy of Sciences Section B 1 (11): 803, 1935.

#### Figura 14A-F

Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios terminais ou intercalares, globosos, subglobosos e ovóides, 25-37,5 × 25-35 µm (média 29,75 × 29,37 µm). Zoósporos encistados, 10-12,5 µm diâm. (média 11,7 µm diâm.), diferenciados dentro de uma vesícula evanescente. Oogônios terminais ou laterais, ovais ou globosos, 16,2-22,5 × 16,2-22,5 µm (média 18,5 × 18,5 µm). Anterídios em forma de sino, monóclinos ou raramente díclinos, 1 por oogônio. Oósporos appleróticos, 12,5-18,7 µm diâm. (14,4 µm diâm.), 1 por oogônio; parede lisa de 1,5 µm de espessura.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de folhas de *Laguncularia racemosa*, 07-XI-2012 com 0,05% de salinidade, isolada em semente de *Sorghum* sp., A.L. Jesus s.n. (CCIBt 4069).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado CCIBt 4069 após 48 h a 23 °C: em CMA sem sal: 5,8 cm, em CMA com 0,5% de sal: 6,2 cm, em CMA com 1% de sal: 5,4 cm, em CMA com 1,5% de sal: 4,5 cm, em CMA com 2% de sal: 3,5 cm, em CMA com 2,5% de sal: 2 cm, em CMA com 3% de sal: 0,7cm.

As características do isolado estão de acordo com Plaats-Niterink (1981). *Pythium vexans* foi descrito por de Bary em 1896, tendo sido isolado a partir de solo e plantas em vários países (Plaats-Niterink 1981). No Brasil foi descrito pela primeira vez por Carvalho (1965), isolado da podridão radicular de *Strelitzia* sp. A espécie foi recentemente transferida para o gênero *Phytopythium* por de Cock *et al.* (2015), tendo em vista análises moleculares. O espécime foi isolado em semente de *Sorghum* sp. e posteriormente mantido em meio de cultura CMA.

## PYTHIACEAE

### Gênero *Pythium* Pringsheim

*Pythium aff. dissotocum* Drechsler, Journal of the Washington Academy of Sciences 20: 402, 1930.

Sinônimos: *Pythium araiosporon* Sideris, Mycologia 24 (1): 38, 1932.

*Pythium oryzae* S. Ito & Tokun., Journal of the Faculty of Agriculture of the Hokkaido Imperial University 32: 201, 1933.

*Pythium perigynosum* Sparrow, Botanical Journal of the Linnean Society 50: 464, 1936.

Figura 15A-F

Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios filamentosos não inflados. Zoósporos encistados, 7,5-10 µm diâm., diferenciados dentro de uma vesícula evanescente. Oogônios lisos ou com apículos, terminais, laterais ou intercalares, esféricos, 22,5-30 µm diâm. (média 25,2 µm diâm.), alguns ovais. Anterídios sésseis, díclinos, raramente monóclinos, 1-3 por oogônio, normalmente 2; atracção apical. Oósporos apleróticos, 20-27,5 µm diâm. (média 24,9 µm diâm.), 1 por oogônio; parede lisa de 2,5 µm de espessura.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de água 07-XI-2012, com 0,8% de salinidade, isolada em semente de *Sorghum* sp., A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4068).

O espécime estudado apresentou características morfológicas semelhantes a *Pythium dissotocum* Drechsler, apresentando apenas oogônios e oósporos maiores que o descrito por Plaats-Niterink (1981), a qual menciona oogônios de 19-26 µm diâm. e oósporos 17-23 µm diâm. O isolado apresentou também diferenças moleculares nas análises de máxima verossimilhança das regiões SSU, ITS e LSU do rDNA (Figuras 21, 25 e 26), quando comparados com sequências da mesma espécie disponíveis no GenBank. O espécime cresceu em semente de *Sorghum* sp. e posteriormente desenvolveu-se em CMA.

***Pythium grandisporangium*** Fell & Master, Canadian Journal of Botany 53 (24): 2920, 1975.

Figura 16A-F

Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios polimórficos, terminais ou intercalares, globosos a irregulares (bursiformes), 40-194 × 17-96 µm (média 122,5 × 47,6 µm), com “tapering neck”; parede lisa hialina a amarelada. Zoósporos encistados, 7,5 -12,5 5µm diâm. (média 9,5µm diâm.), diferenciados dentro de uma vesícula evanescente. Oogônios globosos, esféricos, 25-40 µm diâm. (média 36,4 µm diâm.), amarelados. Anterídios monóclinos ou díclinos, 1-5 por oogônio. Oósporos pleróticos, globosos a esféricos, 20-35 µm diâm. (média 29 µm diâm.) , 1 por oogônio; parede lisa de 2,5-5 µm (média 3,5µm) de espessura.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de água e folhas de *Rhizophora mangle*, 27-VIII-2012 e 07-XI-2012, isolado em semente de *Sorghum* sp., A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4072, CCIBt 4073 e CCIBt 4074).

As características dos espécimes examinados concordam com as descritas por Fell & Master (1975) e Kurokawa & Tojo (2010). Os espécimes cresceram em semente de *Sorghum* sp. e posteriormente desenvolveram-se em PYG 50%. A espécie foi relatada pela primeira vez na Flórida por Fell & Master (1975), posteriormente relatada no Canadá e Holanda por de Cock (1986) e no Japão por Kurokawa & Tojo (2010). Trata-se da primeira citação da espécie para o Brasil.

## SAPROLEGNIALES

### ACHLYACEAE

#### Gênero *Achlya* Nees

##### *Achlya catenulata* sp. nov.

Figura 17A-F

Talo monoico. Gemas presentes, algumas catenuladas. Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios abundantes, fusiformes ou clavados,  $230-460 \times 20-30 \mu\text{m}$  (média  $352 \times 25 \mu\text{m}$ ); renovação simpodial. Liberação dos zoósporos tipo aclióide; zoósporos primários encistados, 7,5-12,5  $\mu\text{m}$  diâm. (média 10  $\mu\text{m}$  diâm.). Oogônios laterais ou terminais, obpiriformes,  $35,0-82,5 \times 27,5-57,5$  ( $49,25 \times 42$ )  $\mu\text{m}$ , catenulados, em cadeia de até 11 oogônios. Anterídios ramificados, díclinos; células anteridiaais simples ou ramificadas; atracação apical, lateral ou por projeções. Oosferas frequentemente abortivas. Oóporos excêntricos esféricos, 15-35  $\mu\text{m}$  diâm. (média 22  $\mu\text{m}$  diâm.), 1-5 em número, geralmente 3 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de água, 29/VIII/2012, 2,8% de salinidade, isolada em sementes de *Sorghum* sp., A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4029).

Crescimento da cultura: colônia com micélio aéreo escasso. Crescimento do isolado após 96 h em 21 °C: Isolado AJM 27 (CCIBt 4029): em MP5 sem sal: 2,2 cm; em MP5 com 0,5% de sal: 2,5 cm; em MP5 com 1,0% de sal: 1,4 cm; em MP5 com 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0% de sal: nenhum crescimento foi observado.

O espécime analisado não apresentou similaridade morfológica com nenhuma das espécies já descritas para o gênero, no entanto, compartilha com o mesmo o tipo de liberação dos zoósporos (aclióide). As análises de máxima verossimilhança das regiões ITS e LSU do rDNA a posicionaram com as outras espécies excêntricas do gênero (*Achlya sensu stricto*), apontando ser uma nova espécie para a ciência (Figuras 27 e 28).

*Achlya aff. flagellata* Coker, The Saprolegniaceae, with notes on other water molds: 116, 1923.

Figura 18A-F

Talo monoico. Gemas presentes. Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios longos, fusiformes,  $210-580 \times 25-50 \mu\text{m}$  (média  $366,3 \times 33,9 \mu\text{m}$ ). Liberação aclióide dos zoósporos; zoósporos primários encistados,  $10-12,5 \mu\text{m}$  diâm. (média  $10,8 \mu\text{m}$  diâm.). Oogônios laterais, esféricos, piriformes,  $77,5-75 \times 72,5-42,5 \mu\text{m}$  (média  $48,9 \times 47 \mu\text{m}$ ). Anterídios monóclinos, raramente andróginos e díclinos; ramos e células anteridiais ramificados; atracação apical ou por projeções. Oosferas frequentemente abortivas. Oósporos excêntricos esféricos,  $22,5-35 \mu\text{m}$  diâm. (média  $29 \mu\text{m}$  diâm.), 1-9 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de folhas de *Rhizophora mangle*, 07-XI-2012, 0,05% de salinidade, isolada em PYG e posteriormente em sementes de *Sorghum* sp., A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4119).

As características morfológicas do espécime examinado são próximas de *Achlya flagellata*, apresentando principalmente oosferas frequentemente abortivas, característica comum da espécie, estando de acordo com as descrições de Johnson (1956) e dos isolados brasileiros (Gomes & Pires Zottarelli 2008, Miranda & Pires Zottarelli 2012). Nas análises de máxima verossimilhança das regiões ITS e LSU da rDNA, o isolado não apresenta alta similaridade com outras sequências de *A. flagellata* disponíveis no GenBank, por esta razão foi colocado aqui como *Achlya aff. flagellata*, pois compartilha semelhança morfológica com a espécie (Figuras 27 e 28).

*Achlya klebsiana* Pieters, Botanical Gazette Crawfordsville 60 (6): 486. 1915.

Figura 19A-F

Talo monoico. Gemas presentes. Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios abundantes, fusiformes,  $320-620 \times 20-40 \mu\text{m}$  (média  $441,3 \times 33 \mu\text{m}$ ). Liberação dos zoósporos tipo aclióide; zoósporos primários encistados,  $8,75-12,5 \mu\text{m}$  diâm (média  $10,2 \mu\text{m}$  diâm.). Oogônios laterais e terminais, obpiriformes esféricos,  $37,5 \times 60 \mu\text{m}$  diâm. (média  $48 \mu\text{m}$  diâm.). Anterídios ramificados,

díclinos, raramente monóclinos; ramos anteridiais ramificados, atracação apical ou por projeções. Oosferas frequentemente abortivas. Oóporos excêntricos, esféricos, 15-22,5 µm diâm. (média 19,7 µm diâm.), 2-8 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de água, 27/II/2013, 0,05% de salinidade, isolada em sementes de *Sorghum* sp., A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4071).

As características do espécime examinado concordam com as descritas por Johnson (1956) e com o isolado brasileiro descrito por Gomes *et al.* (2003), porém apresenta zoósporos, oogônios e oósporos maiores que o descrito por Pires-Zottarelli *et al.* (1996), as quais citam zoósporos de 7-11 µm de diâm., oogônios de 31-45 µm de diâm. e oósporos de 15-25 µm diâm. O isolado também apresentou oosferas frequentemente abortivas, característica não descrita para a espécie. Johnson *et al.* (2002) coloca várias espécies como sinonímia de *Achlya debaryana* por possuírem características em comum, dentre elas *A. klebsiana* e *A. flagellata*. Uma revisão do gênero deve ser realizada para a confirmação desta hipótese. Análises moleculares de isolados do GenBank de *A. flagellata* e *A. klebsiana* apresentaram ser estas espécies distintas, contrariando a hipótese de Johnson *et al.* (2002), como consta nas figuras 27 e 28.

## VERRUCALVACEAE

### Gênero *Aphanomyces* de Bary

*Aphanomyces laevis* de Bary, Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik 2: 179. 1860.

Figura 20A-F

Talo monoico. Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios filamentosos com uma fileira de zoósporos. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 7,5-10 µm diâm. (média 8,5 µm diâm.) Estruturas sexuais não observadas.

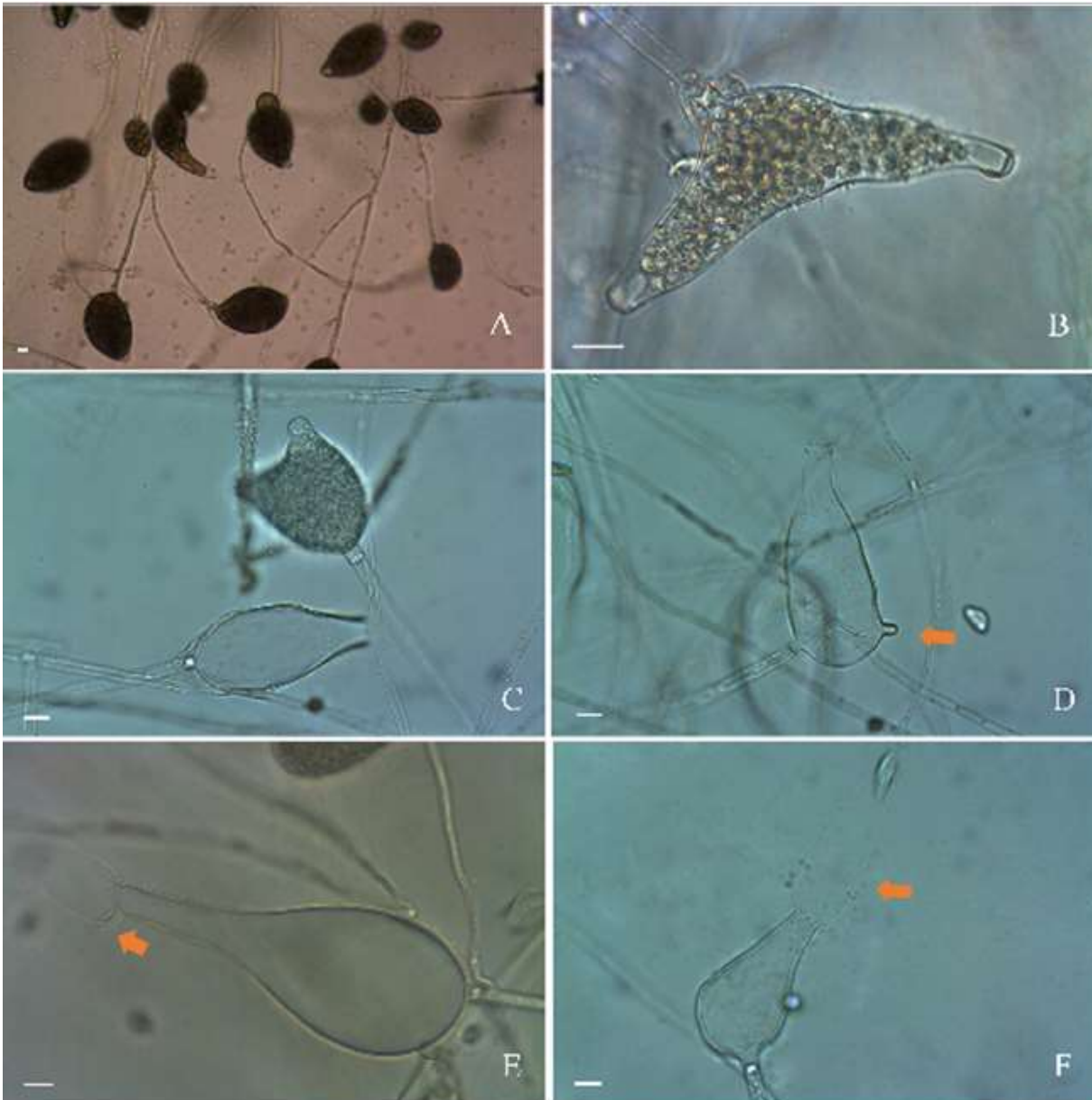
Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, amostras de água 07-XI-2012, 0,05% de salinidade, isolada em sementes de *Sorghum* sp., A.L. Jesus *s.n.* (CCIBt 4070).

O espécime não apresentou estruturas sexuais durante os estudos, porém análises moleculares das regiões ITS e 28S apontaram 99% de similaridade com as sequências de *Aphanomyces laevis* disponibilizadas no GenBank (Figuras 27 e 28).

### 3. Análise da comunidade

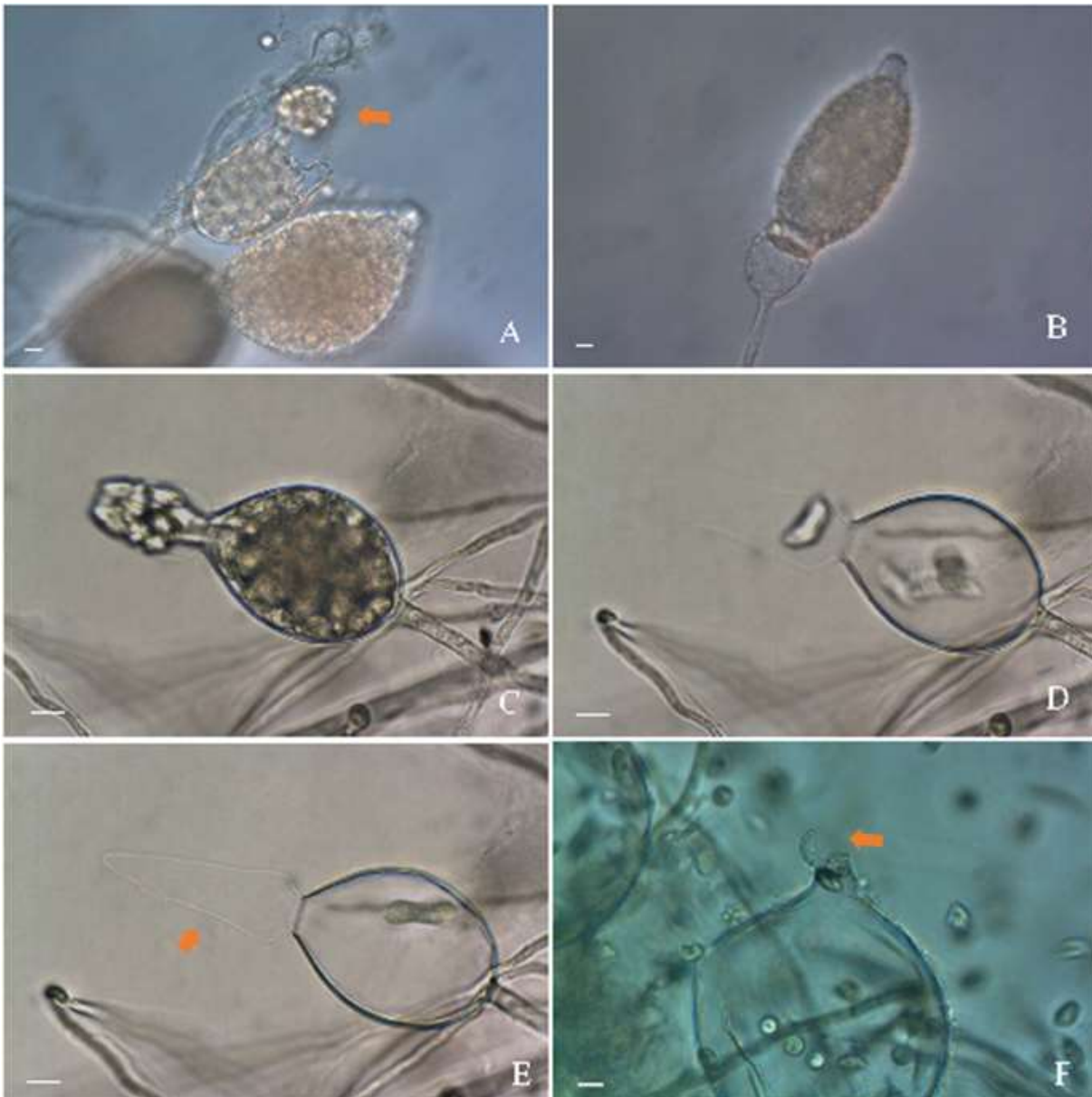
A abundância e a frequência dos oomicetos em cada tipo de amostra (água, folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*) constam das tabelas 2, 3 e 4. As espécies mais frequentes e abundantes foram *Halophytophthora vesicula* e *H. spinosa* var. nov., concordando com resultados obtidos por Newell & Fell (1997) e Nakagiri (2000). *Halophytophthora vesicula* esteve presente nas quatro coletas, demonstrando ser um forte competidor. Sua frequência e abundância foi maior em folhas de *R. mangle* (100% e 15,28%, respectivamente), enquanto *H. spinosa* var. nov. foi a segunda espécie mais frequente e abundante (75% e 11,11%, respectivamente). A alta frequência destas espécies está relacionada à adaptação das mesmas aos ecossistemas de manguezais, pois possuem ampla tolerância a diferentes níveis de pH, salinidade e temperatura (Leaño *et al.* 2000).

Espécies do gênero *Halophytophthora* são predominantes em áreas de manguezais, podendo ocorrer em todas as regiões tropicais e subtropicais (Newell & Fell 1997, Nakagiri 2000). No entanto, Nakagiri (2000) relatou que algumas das espécies possuem distribuição restrita, como *H. avicennae*, a qual foi originalmente isolada de *Avicennia marina*; entretanto foi isolada no PEIC de *R. mangle*, demonstrando sua não especificidade por substrato.



**Figura 3 A-F.** *Halophytophthora avicennae* (Gerretton-Cornell & J.A. Simpson) H.H. Ho & S.C. Jong. A. Zoosporângios em *Sorghum* sp. B-C. Zoosporângios com dois poros de liberação. D. Zoosporângio com projeção hifal. E. Zoosporângio operculado. F. Zoosporângio com vesícula alongada. Barra = 10  $\mu$ m.

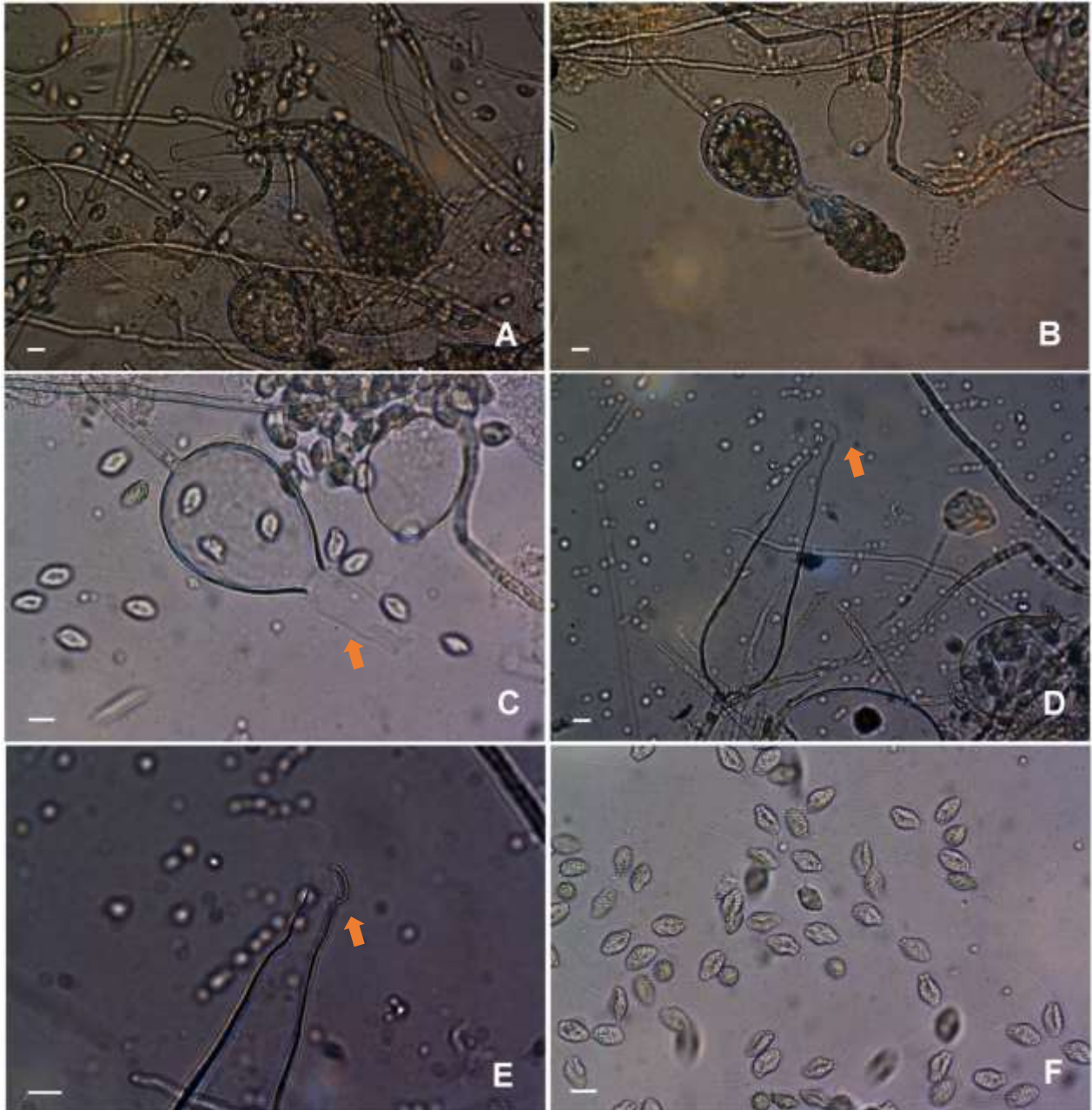




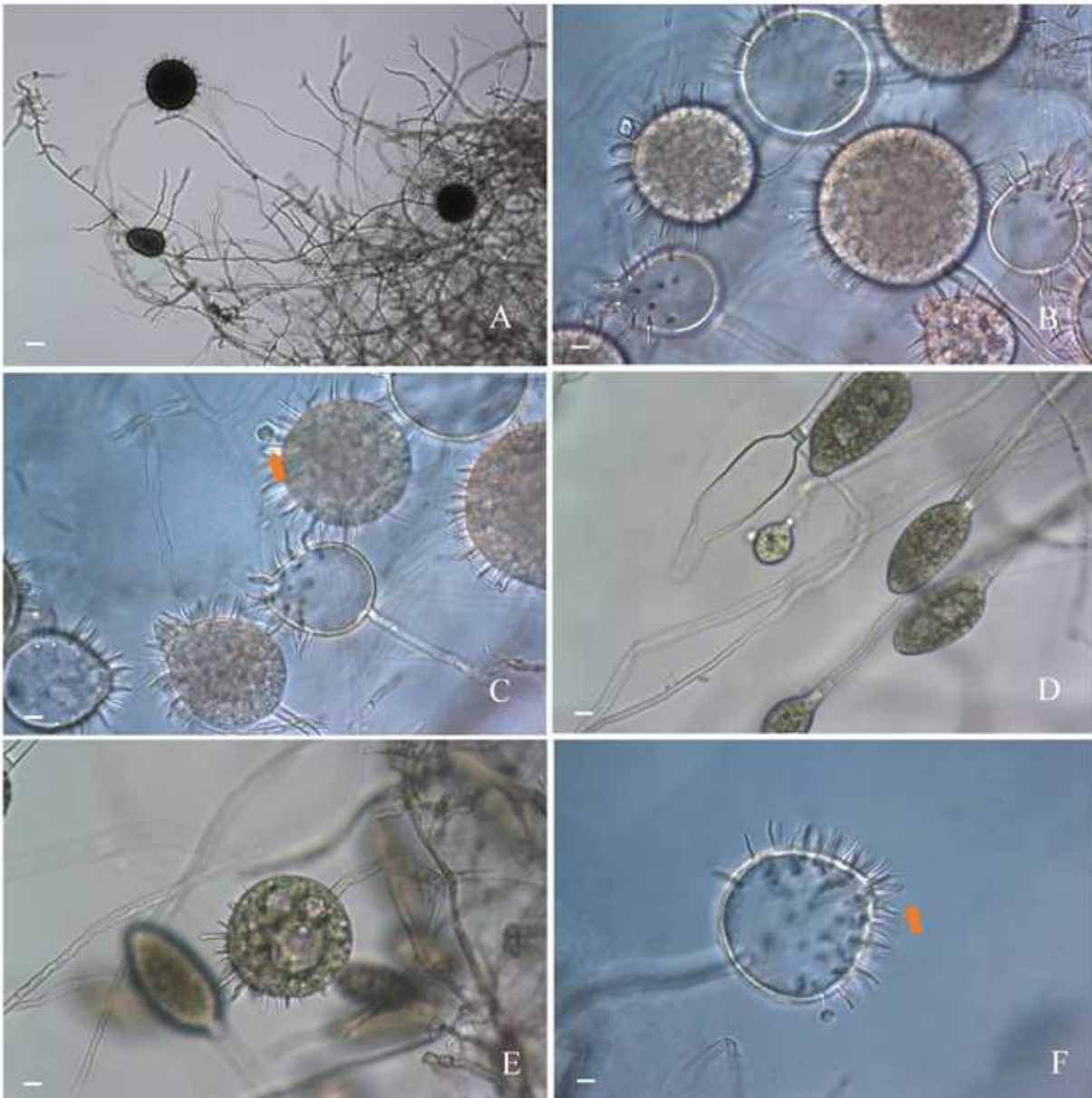
**Figura 4 A-F.** *Halophytophthora polymorphica* (Gerretton-Cornell & J.A. Simpson) H.H. Ho & S.C. Jong. A. Zoosporângios com dois poros, coma liberação ocorrendo apenas por um. B. Zoosporângio. C-D. Liberação de zoósporos. E. Vesícula alongada após liberação. F. Zoosporângio operculado. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 5 A-F.** *Halophytophthora vesicula* (Anastasiou & Churchl.) H.H. Ho & S.C. Jong. A. Zoosporângios em PYGs e água com salinidade 50%. B. Zoosporângios. C. Liberação dos zoósporos. D. Vesícula alongada após liberação de zoósporos. E-F. Zoosporângios após um tempo de liberação com vesícula e opérculo evidentes. Barra = 10  $\mu$ m.



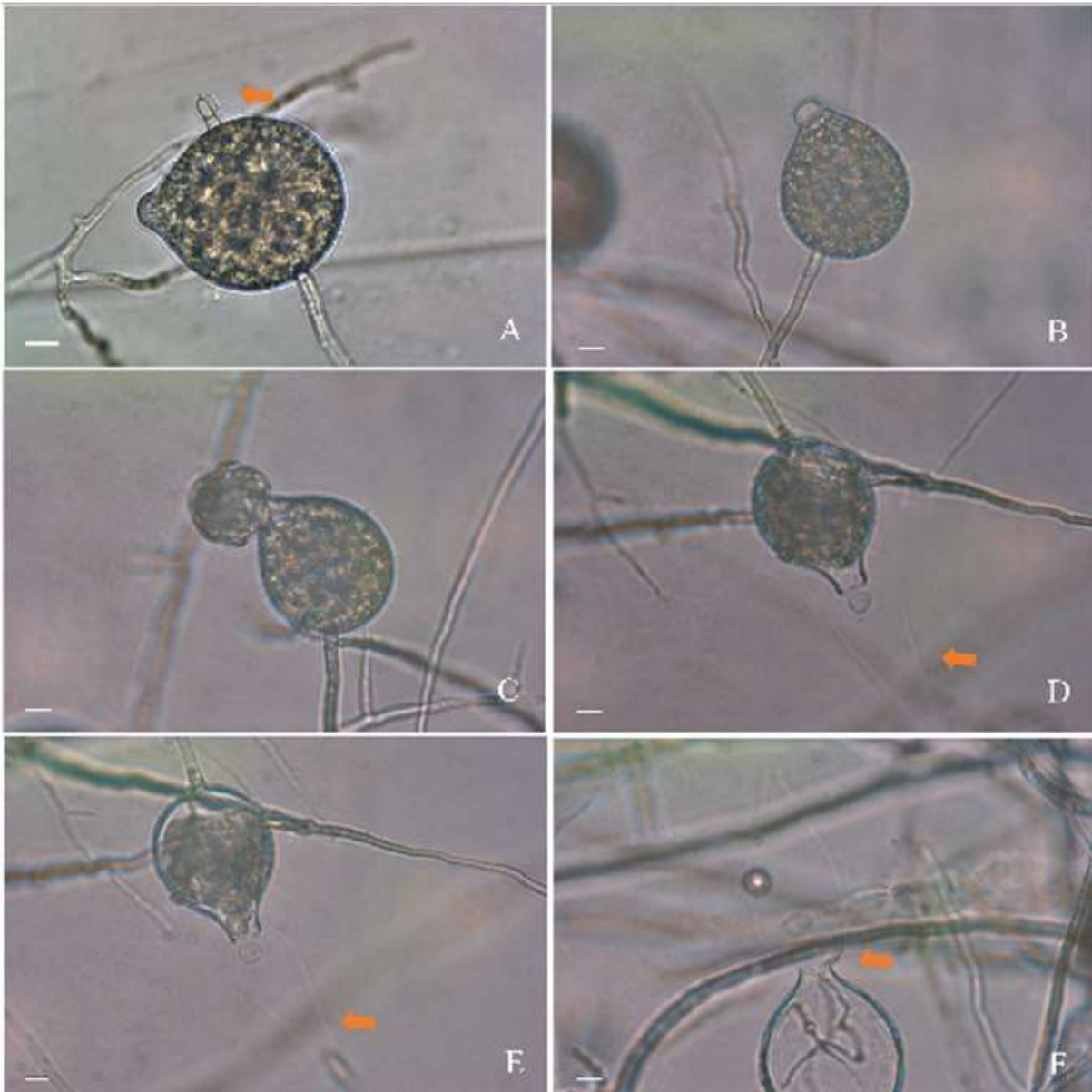
**Figura 6 A-F.** *Halophytophthora vesicula* (Anastasiou & Churchl.) H.H. Ho & S.C. Jong. A. Zoosporângio. B. Liberação de zoósporos. C. Vesícula alongada após liberação de zoósporos. D-E. Zoosporângios operculados. F. Zoósporos biflagelados. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7 A-F.** *Halophytophthora spinosa* var. nov. A. Zoosporângios em PYGs e água com salinidade 50%. B-C. Zoosporângios ornamentados. D. Zoosporângios lisos. E. Zoosporângios ornamentados e lisos. F. Zoosporângio vazio com tubo de liberação curto. Barra = 10  $\mu$ m.



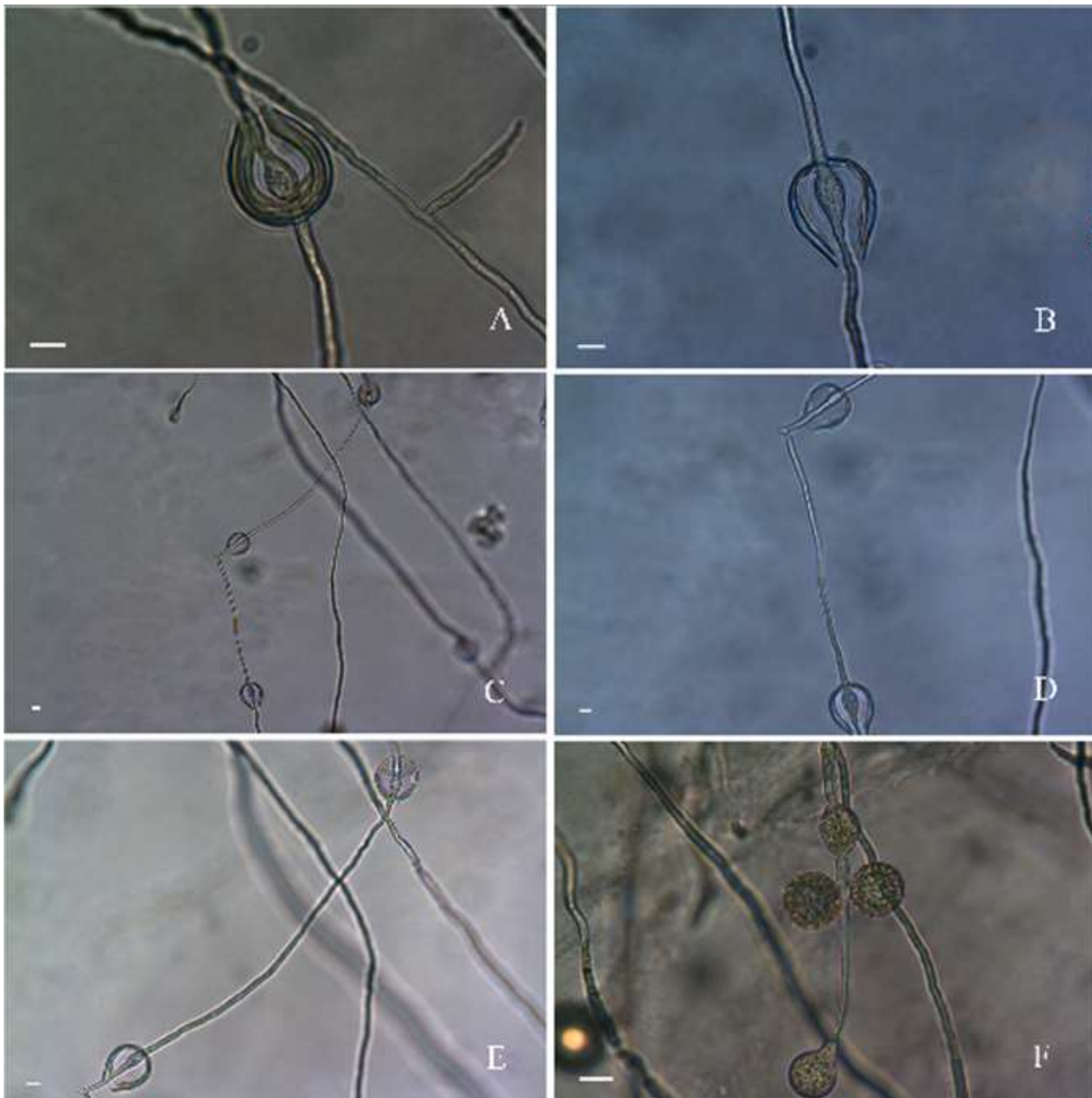
**Figura 8 A-F.** *Halophytophthora* sp. nov. 1. A. Zoosporângios com vesícula alongada. B-C. Zoosporângios com dois poros de liberação, um operculado e outro com vesícula interna. D. Oogônio globoso com oósporo plerótico. E-F. Oogônios com anterídio díclino e anfígeno, respectivamente. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 9 A-F.** *Halophytophthora* sp. nov. 2. A. Zoosporângio com projeção hifal. B. Individualização dos zoósporos dentro do zoosporângio formando uma falsa papila. C. Liberação de zoósporos em uma vesícula globosa. D-E. Zosporângios com vesícula alongada. F. Zoosporângio com vesícula alongada e opérculo. Barra = 10  $\mu$ m.

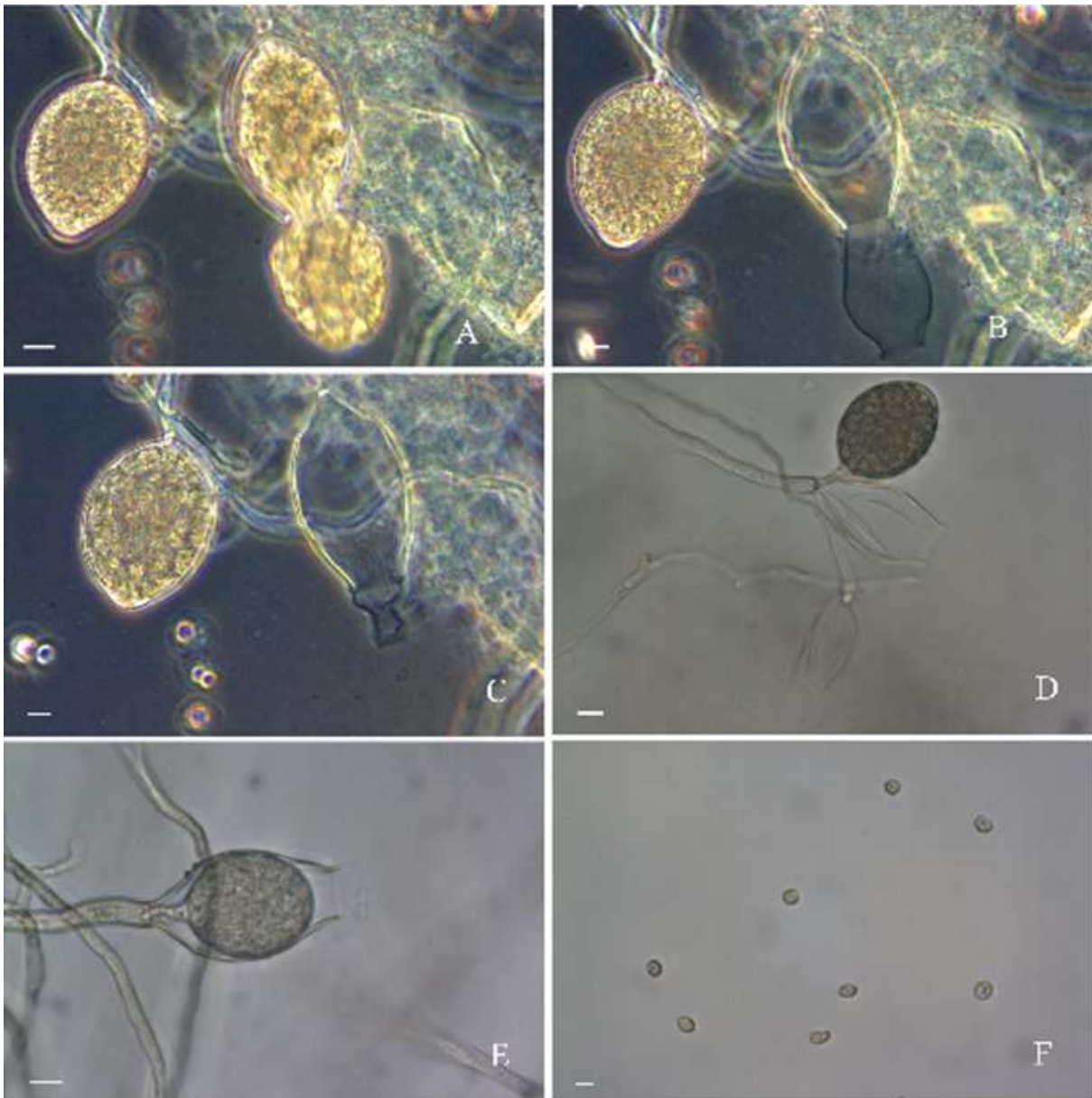


**Figura 10 A-F.** *Phytophthora* sp. A. Zoosporângio. B. Liberação de zoósporos em uma vesícula globosa. C-D. Opérculo visível após liberação. E-F. Dilatações hifálicas. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 11 A-F.** *Phytophthora* sp. nov. 1. A-E. Zoosporângios com proliferação interna. F. Dilatações hifálicas. Barra = 10 µm.





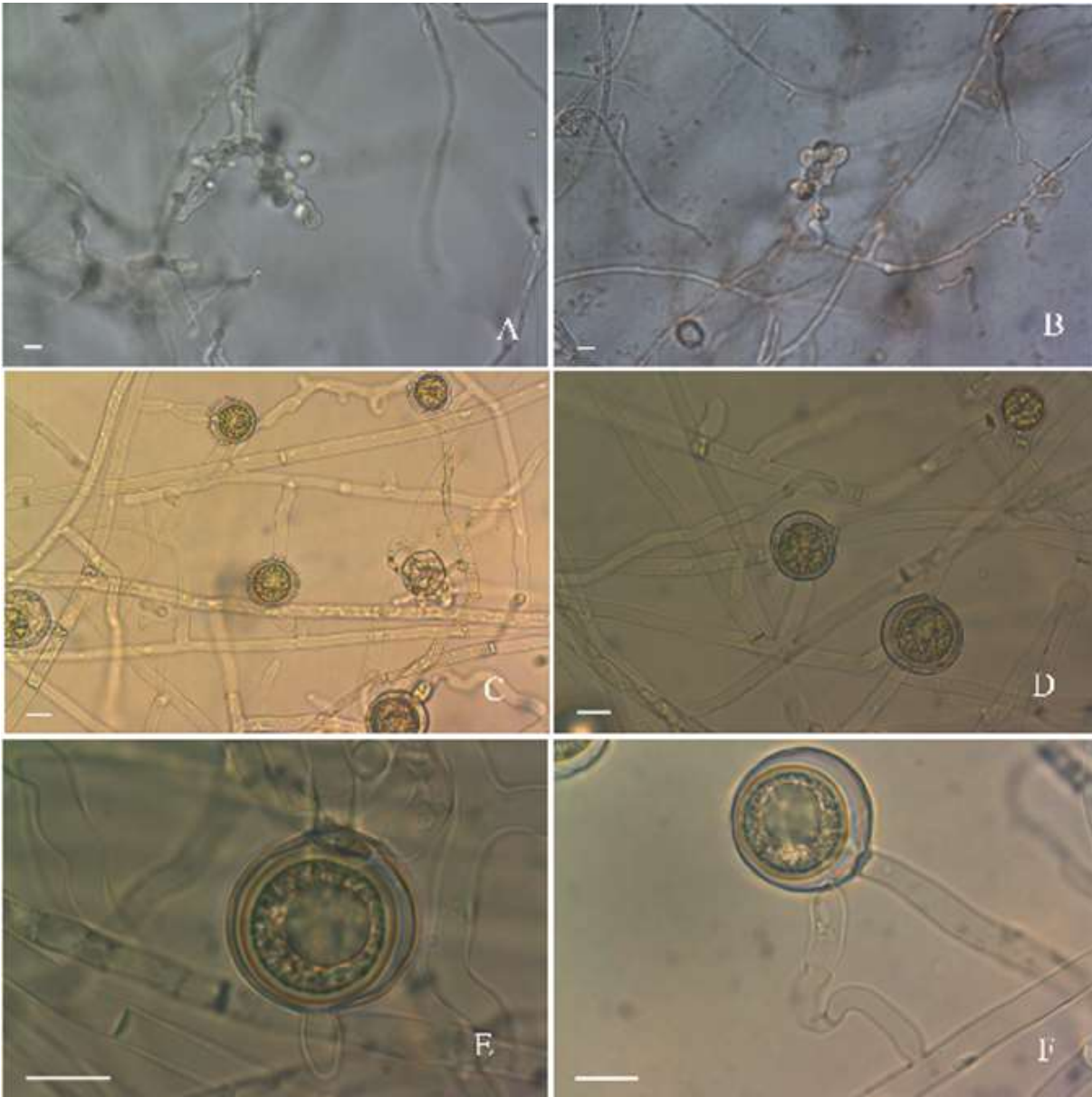
**Figura 12 A-F.** *Phytophthora* sp. nov. 2. A. Liberação de zoósporos em uma vesícula. B. Zoosporângio com vesícula alongada persistente. C. Vesícula contraída alguns minutos após a liberação. D. Zoosporângio não papilado. E. Zoosporângio com proliferação interna. F. Zoósporos. Barra = 10  $\mu$ m.



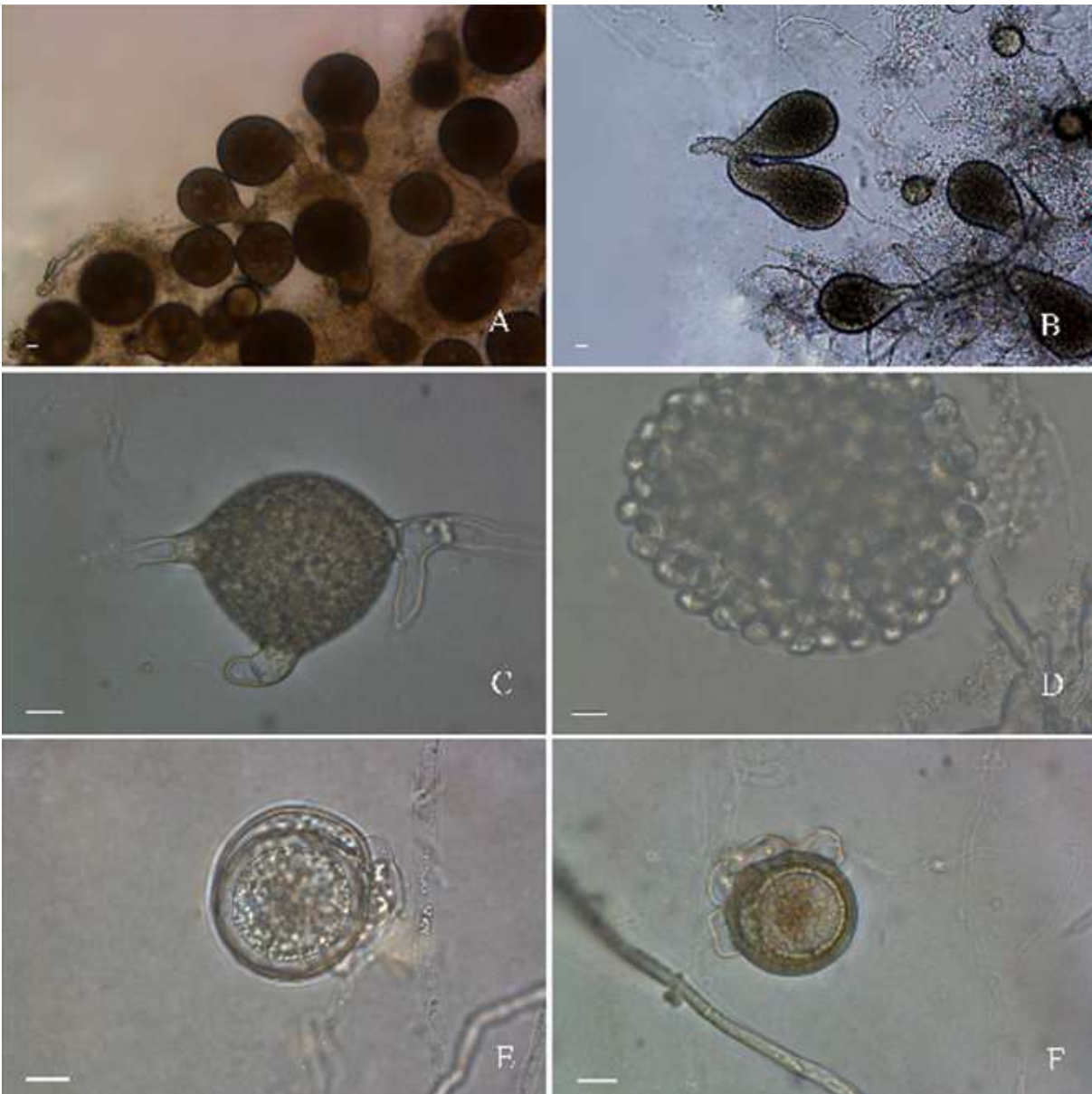
**Figura 13 A-F.** *Phytophthium kandeliae* (H.H. Ho, H.S. Chang & S.Y. Hsieh) Thines. A. Migração de parte do protoplasma do zoosporângio para uma vesícula. B-C. Processo de maturação dos zoósporos. D. Zoósporos em processo final de maturação dentro do zoosporângio e na vesícula. E-F. Opérculo visível após a liberação dos zoósporos. Barra = 10  $\mu$ m.



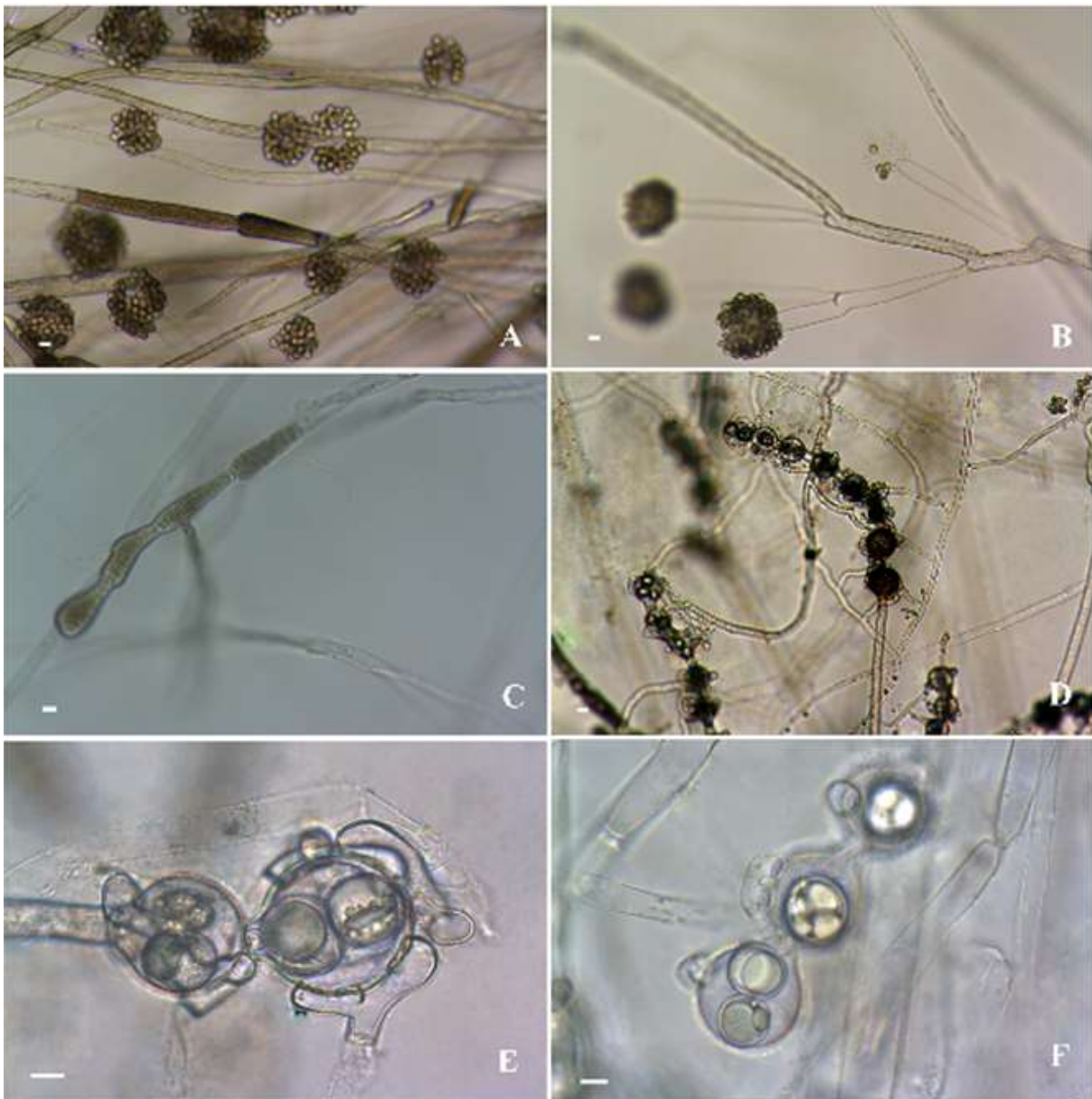
**Figura 14 A-F.** *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque. A. Migração do protoplasma do zoosporângio para uma vesícula. B. Maturação dos zoósporos dentro da vesícula. C. Zoosporângio vazio após a liberação. D. Oogônio com anterídio monóclino. E-F. Oogônios com anterídios em forma de sino. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figuras 15 A-F.** *Pythium aff. dissotocum* Drechsler. A-B. Zoosporângios. C-D. Oogônios intercalares em meio de cultura. E. Oogônio com apículo. F. Oogônio com anterídio díclino. Barra = 10  $\mu$ m.



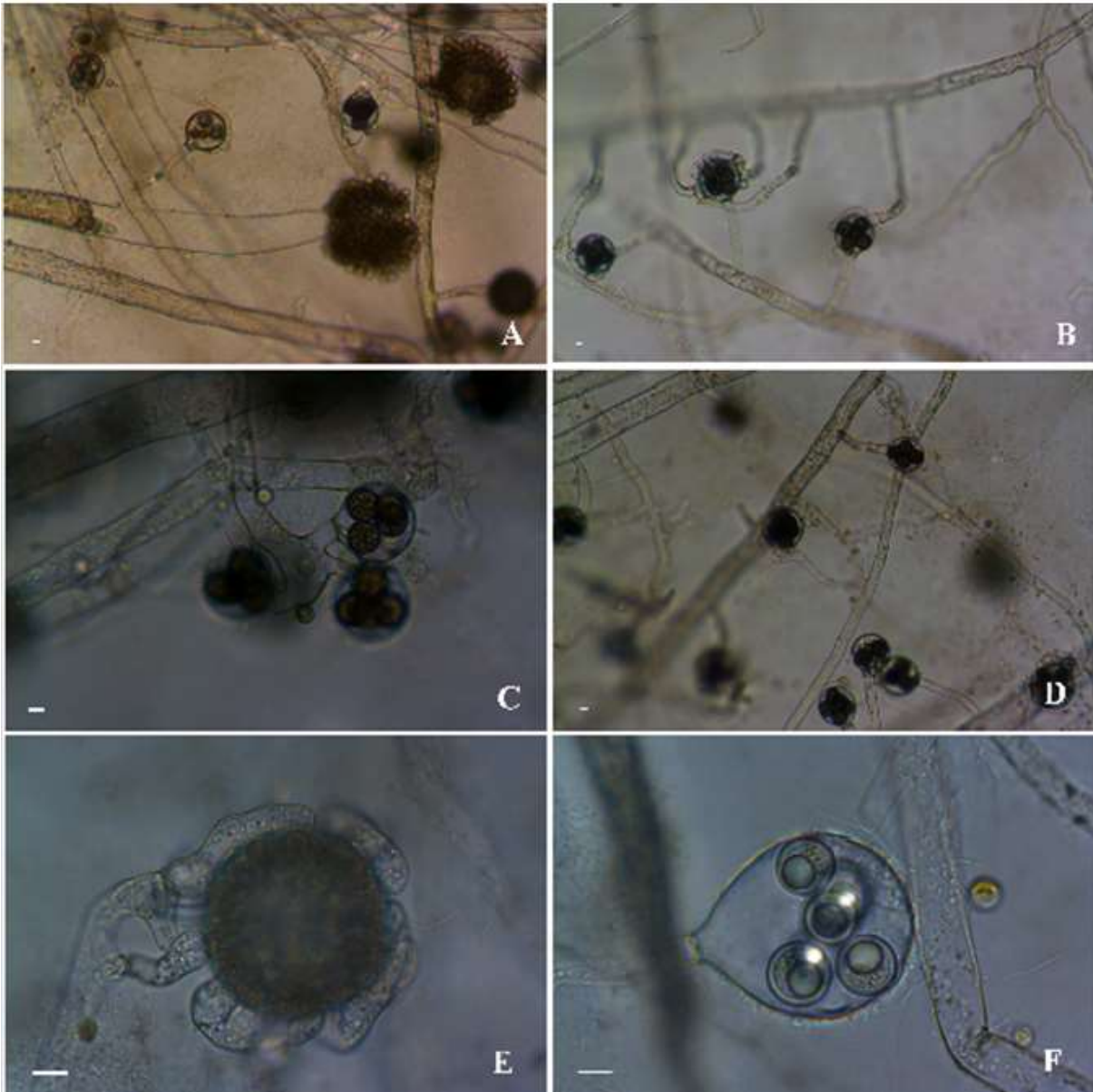
**Figuras 16 A-F.** *Pythium grandisporangium* Fell & Master. A-B. Zoosporângio polimórficos (bursiformes). C. Zoosporângio intercalar em meio de cultura. D. Maturação dos zoósporos em uma vesícula evanescente. E-F. Oogônio com anterídio. Barra = 10 µm.



**Figura 17 A-F.** *Achlya catenulata*. A. Liberação dos zoósporos tipo aclióide. B. Renovação simpodial dos zoosporângios. C. Gemas. D. Oogônios catenulados e anterídios díclinos. E-F. Oogônios catenulados com oósporos excêntricos. Barra = 10 μm.

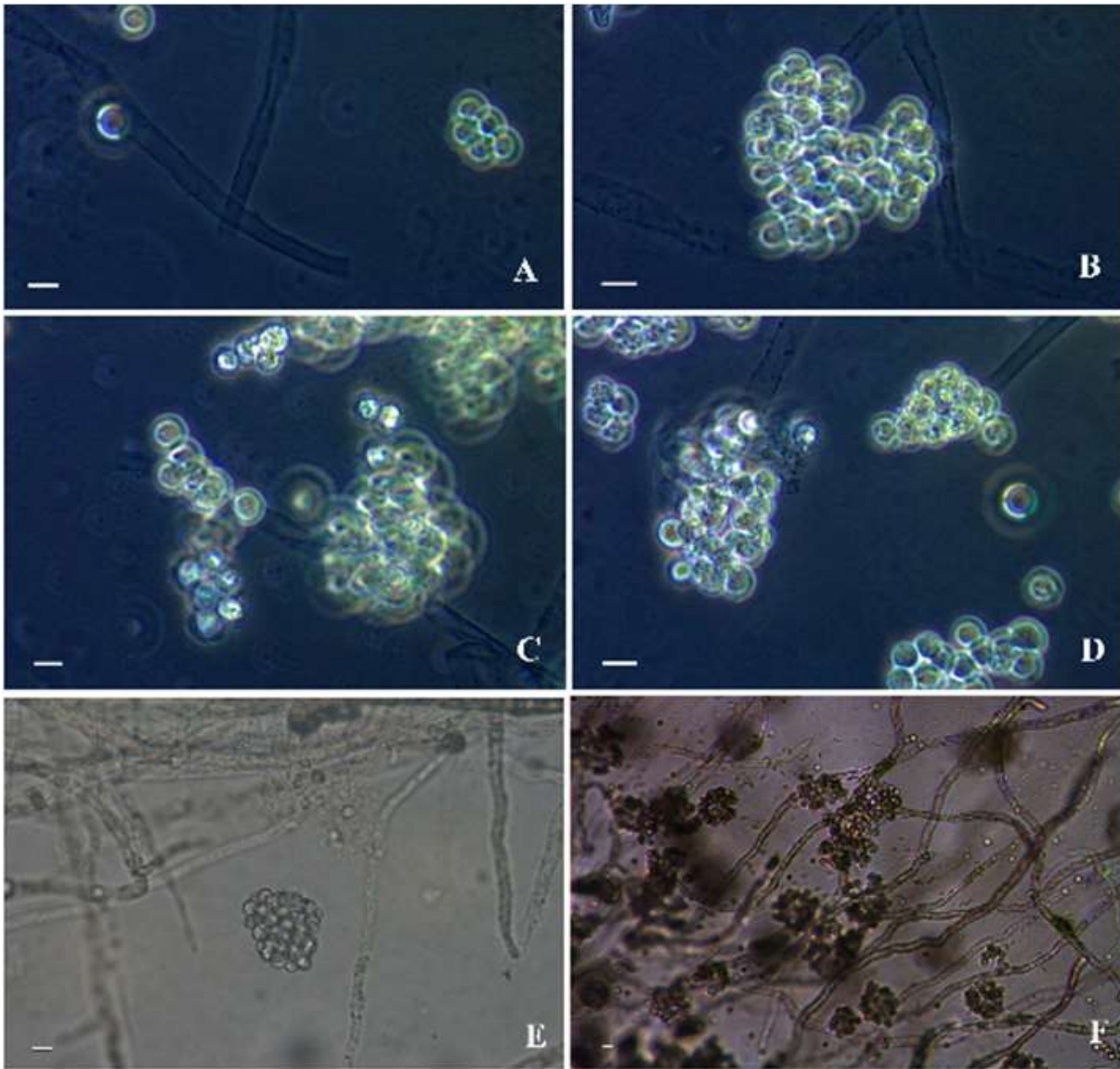


**Figura 18 A-F.** *Achlya aff. flagellata* Coker. A-B. Zoosporângios fusiformes com zoósporos primários encistados no ápice. C. Oogônios em início de formação. D-F. Vários anterídios por oogônio. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19 A-F.** *Achlya klebsiana* Pieters. A. Zoosporângios fusiformes com zoósporos primários encistados no ápice. B. Oogônios com anterídios díclinos. C-D. Oósporos em processo de maturação. E. Vários anterídios por oogônio. F. Oogônio com oósporos excêntricos. Barra = 10  $\mu$ m.





**Figura 20 A-F.** *Aphanomyces laevis* de Bary. A-E. Zoósporos encistados no ápice dos zoosporângios após liberação. F. Aspecto geral do micélio. Barra = 10  $\mu$ m.

Neste estudo também foi relatada a ocorrência de espécies pertencentes aos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Pythium* e *Phytophthora*, as quais tiveram maior abundância nas amostras de água e em salinidades mais baixas (até 1%). Isto corrobora os achados de Padgett (1978), o qual afirmou que espécies de Saprolegniaceae *sensu lato* podem sobreviver em ambientes com altas salinidades, desde que em algum momento, durante o ciclo das marés, a salinidade abaixe consideravelmente até valores mínimos.

Algumas espécies foram exclusivas de amostras de água como *Pythium aff. dissotocum*, *Achlya klebsiana* e *Aphanomyces laevis*, as quais ocorreram em salinidade abaixo de 1%. *Halophytophthora avicennae*, *Achlya flagellata* e as duas espécies novas de *Phytophthora* foram exclusivas de folhas de *R. mangle*, sendo *A. flagellata* e *H. avicennae* também encontradas em salinidade abaixo de 1%. As espécies exclusivas de folhas de *L. racemosa* foram *Halophytophthora* sp. nov. 2 e *Phytopythium vexans*, sendo *P. vexans* isolado na menor salinidade (0,05%).

Considerando todas as coletas e as triplicatas para cada tipo de isca, foram registrados os valores de riqueza (*S*), índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ,  $\log_2$ ), equitabilidade (*E*) e dominância de Simpson (*D*) (Tabela 5). Apesar de cada amostra ter sua particularidade, os índices biológicos demonstram uma comunidade diversa e distribuição uniforme dos táxons, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ) conforme o  $H'$  t test.

**Tabela 5.** Riqueza em espécies (*S*), equitatividade (*E*), índice de diversidade de Shannon ( $H'$   $\log_2$ ) e dominância de Simpson (*D*) de amostras de água e das folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*. Letras iguais significam que não houve diferença significativa.

Índice	Água	<i>R. mangle</i>	<i>L. racemosa</i>
<i>S</i>	12a	13a	12a
<i>E</i>	1a	1a	1a
$H'$ ( $\log_2$ )	2,4a	2,6a	2,5a
<i>D</i>	0,09a	0,08a	0,08a

A abundância e composição das espécies nas folhas de *R. mangle* e *L. racemosa* não apresentaram diferenças significativas segundo o teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ), o mesmo

acontecendo quando consideradas as diferentes salinidades (aqui desconsiderada a Lagoa da Praia pela ausência de folhas de *L. racemosa*). O teste de Shapiro-Wilk demonstrou que estes dados não apresentaram distribuição normal ( $p < 0,05$ ) (Anexos I e II). No entanto, quando consideradas as quatro coletas, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), com a distribuição não normal dos dados ( $p < 0,05$ ). O teste Mann-Whitney (com a correção de Bonferroni) mostrou significância entre a primeira e a terceira em relação à quarta coleta (Tabela 6), com a quarta coleta apresentando o menor número de isolados de oomicetos. Ressalta-se aqui que, em água, nenhuma ocorrência foi verificada e nas folhas somente *H. vesicula* e *H. spinosa* var. nov. foram isoladas. Estes resultados demonstram uma similaridade maior da quarta com a segunda coleta, a qual também apresentou um número mais baixo de isolados (Tabelas 2, 3 e 4). Provavelmente flutuações dos fatores abióticos podem ter sido mais importantes para esta significância do que as diferenças na composição química das folhas.

**Tabela 6.** Comparação da abundância e composição de espécies entre as coletas realizadas segundo o teste de post-hoc Mann-Whitney. 1C= 1ª Coleta (agosto/2012), 2C=2ª Coleta (novembro/2012), 3C=3ª Coleta (fevereiro/2013), 4C=4ª Coleta (junho/2013).

	1C	2C	3C	4C
1C		0,4732	1	0,00623
2C	0,4732		0,5071	0,6757
3C	1	0,5071		0,01163
4C	0,00623	0,6757	0,01163	

Não foi possível a identificação de todos os isolados, especialmente os de *Halophytophthora*, em nível específico, permanecendo vários deles em nível de gênero, fato que pode ter interferido negativamente nas análises ecológicas, embora todos os dados tenham sido transformados em LN (x+1) para diminuir o erro amostral. Deve ser ressaltado que as características morfológicas das espécies do gênero *Halophytophthora* são superficiais para a determinação segura em nível de espécie, necessitando assim de análises moleculares. Suas culturas são de difícil manutenção, pois necessitam de repiques a cada quinze dias (Nakagiri 2012), o que fez com que algumas tenham sido perdidas ao longo tempo, tendo prejudicado a identificação das mesmas.

#### 4. Análises filogenéticas

Foram obtidas 249 sequências de diferentes regiões gênicas (67 sequências de SSU, 69 de ITS total e 79 de LSU do rDNA e 34 de COX I do mDNA) de 146 isolados do PEIC e de 30 isolados de *Halophytophthora* e *Salisapilia* importadas do “CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre”, Utrecht, Holanda (Tabela 7).

As sequências gênicas dos isolados estão sendo depositadas no GenBank à medida que os artigos são redigidos e enviados para publicação. A dificuldade para amplificação e sequenciamento da região ITS impossibilitou a obtenção de sequências para alguns dos isolados. A região COX I foi sequenciada apenas para melhor identificação dos isolados e de forma a permitir o maior acúmulo de informações gênicas dos mesmos, especialmente para aqueles que são espécies novas ou primeira citação para o Brasil.

Os isolados analisados neste estudo pertencem às duas ordens: PERONOSPORALES *sensu lato* com os gêneros *Halophytophthora*, *Phytophthora*, *Phytopythium*, *Pythium* e *Salisapilia* e SAPROLEGNIALES com os gêneros *Achlya*, *Aphanomyces* e *Dictyuchus*, conforme classificação proposta por Beakes *et al.* (2014).

**Tabela 7.** Número na CCIBT e regiões gênicas sequenciadas do rDNA e mDNA de cada isolado. \* Regiões já sequenciadas dos isolados. Isolados com as regiões sequenciadas já depositadas no GenBank se encontram com o número de registro.

Táxons	CCIBT	SSU	ITS	LSU	COX I
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 1	4109	*		*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 12		*	*	*	
<i>Phytophthora</i> sp. AJM 14	4120	*	*	*	
<i>Achlya aff. flagellata</i> AJM 19	4119	*	*	*	
<i>Phytophthora</i> sp. nov. 1 AJM 21			*	*	*
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 1 AJM 23		*	*	*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 24		*	*	*	
<i>Phytopythium kandeliae</i> AJM 26	4023	KJ399967	KJ399962	KJ399965	
<i>Achlya catenulata</i> sp. nov. AJM 27	4029	*	KP006455	KP006449	KR264879
<i>Halophytophthora polymorphica</i> AJM 31	4111	*	*	*	*
<i>Phytophthora</i> sp. nov. 2. AJM 32	4116	*	*	*	*
<i>Halophytophthora polymorphica</i> AJM 33	4112	*	*	*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 34a		*	*	*	

*Continua*

Táxons	CCIBT	SSU	ITS	LSU	COX I
<i>Pythium grandisporangium</i> AJM 34b	4072	*		*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 39		*	*		
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 40			*	*	
<i>Phytophthora</i> sp. nov. 1 AJM 41	4121		*		*
<i>Halophytophthora avicenniae</i> AJM 45		*	*	*	*
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 1 AJM 46	4113	*	*	*	*
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 1 AJM 53		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 54		*	*	*	
<i>Phytophthora</i> sp. AJM 55		*	*	*	
<i>Pythium grandisporangium</i> AJM 56	4073	*	*	*	*
<i>Pythium</i> aff. <i>dissotocum</i> AJM 58B	4068	*	*	*	*
<i>Pythium</i> sp.1 AJM 58C		*	*	*	*
<i>Phytophythium vexans</i> AJM 60	4069		KR092140		*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 62			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 63				*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 67		*	*	*	
<i>Halophytophthora spinosa</i> AJM 68		*	*	*	*
<i>Pythium</i> sp.1 AJM 69		*	*	*	
<i>Pythium grandisporangium</i> AJM 71	4074	*	*	*	*
<i>Pythium</i> sp.1 AJM 72		*	*	*	
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 2 AJM 74		*	*	*	*
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 2 AJM 75		*	*	*	*
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 2 AJM 76	4114	*		*	*
<i>Halophytophthora spinosa</i> AJM 78		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 79	4110	*		*	
<i>Halophytophthora spinosa</i> var. nov. AJM 80		*			*
<i>Halophytophthora spinosa</i> var. nov. AJM. 82		*		*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 83		*	*		
<i>Phytophythium kandeliae</i> AJM 85	4024	KJ406205		KJ399964	KJ690247
<i>Pythium</i> sp.1 AJM 87		*	*	*	
<i>Aphanomyces laevis</i> AJM 88	4070	*	KP006463	KP006453	
<i>Pythium</i> sp.1 AJM 89		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 90		*	*	*	
<i>Pythium</i> sp.1 AJM 92			*	*	
<i>Phytophythium kandeliae</i> AJM 95	4025	KJ399968		KJ399966	KJ690248
<i>Halophytophthora spinosa</i> AJM 98	4115		*	*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 99		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 100			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 101		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 102		*		*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 104		*	*	*	
<i>Phytophthora</i> sp. nov. 2 AJM 105		*	*	*	*
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 107		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 108		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 111			*	*	
<i>Continua</i>					

Táxons	CCIBT	SSU	ITS	LSU	COX I
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 113				*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 115			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 116			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 117			*	*	
<i>Achlya</i> sp.1 AJM 118		*	*	*	
<i>Achlya klebsiana</i> AJM 119	4071	*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 120			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 121		*		*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 122		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 123			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 124		*	*	*	
<i>Halophytophthora</i> sp. nov. 1 AJM 125		*	*		
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 126			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 133			*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 134		*		*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 137		*		*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 144		*		*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 147		*	*	*	
<i>Halophytophthora vesicula</i> AJM 148		*	*	*	
<i>Halophytophthora exoprolifera</i> CBS 251.93	NA	*	*	*	*
<i>Halophytophthora exoprolifera</i> CBS 252.94	NA		*		
<i>Phytophthium kandeliae</i> CBS 113.91	NA		KJ399961	KJ399963	KJ690245
<i>Halophytophthora vesicula</i> CBS 393.81	NA	*		*	*
<i>Halophytophthora batemanensis</i> CBS 679.84	NA	*	*	*	
<i>Halophytophthora polymorphica</i> CBS 680.84	NA	*	*	*	*
<i>Halophytophthora spinosa</i> var. <i>spinosa</i> CBS 591.85	NA	*		*	*
<i>Halophytophthora spinosa</i> var. <i>lobata</i> CBS 588.85	NA	*	*		*
<i>Salisapilia nakagiri</i> CBS 127.947	NA			*	
<i>Salisapilia sapeloensis</i> CBS 127.946	NA	*	*	*	*
<b>Total</b>		<b>67</b>	<b>69</b>	<b>79</b>	<b>34</b>

As sequências da região SSU, marcador mais utilizado para análises de filogenia em eucariontes, dos isolados de Peronosporales obtidos neste estudo, e dos isolados dos gêneros *Halophytophthora* e *Salisapilia* importados da CBS, foram comparadas e analisadas com as sequências de espécies tipo disponíveis no GenBank. A árvore de máxima verossimilhança (Figura 21) evidencia que os isolados distribuem-se em seis clados: clado *Halophytophthora*, clado *Phytophthora*, clado *Phytophthium* (*Pythium* clado K de Lévesque & de Cock (2004), o qual agrega espécies com características morfológicas e filogenéticas entre os gêneros *Pythium* e *Phytophthora*),

clado *Pythium*, clado *Salisapilia* e clado “spinosa”. As espécies do gênero *Halophytophthora* são parafiléticas, como já mencionado por Lara & Belbahri (2011) e Nigrelli & Thines (2013), estando bem suportadas nos clados *Halophytophthora* I sensu stricto, *Phytophthora* e *Phytopythium*. *Halophytophthora* II com a espécie *H. exoprolifera*, não se encontra em nenhum clado definido, assim como *Halophytophthora* III com as espécies *H. epistomium* e *H. masteri*. *H. elongata* e *H. operculata* também são parafiléticas ao clado *Halophytophthora* I sensu stricto, estando elas agrupadas nos clados *Phytophthora* e *Phytopythium*, respectivamente. Os isolados de *H. spinosa*, como já mencionado por Nakagiri (2002), não é um membro do clado *Halophytophthora* I sensu stricto e forma um clado distinto dentro de Peronosporales. Este clado engloba as duas variedades já descritas em literatura (*H. spinosa* var. *spinosa* e *H. spinosa* var. *lobata*), e uma variedade apresentada como nova neste trabalho.

#### 4.1. Ordem Peronosporales sensu lato

A análise de máxima verossimilhança da região LSU (Figura 22) com os isolados obtidos dos gêneros de Peronosporales (*Halophytophthora*, *Phytophthora*), apresenta três clados distintos: clado *Halophytophthora* sensu stricto, clado *Phytophthora* e clado “spinosa”. A árvore evidencia seis espécies no clado *Halophytophthora* sensu stricto, sendo que *H. exoprolifera* é parafilética ao grupo e *H. spinosa* forma um novo clado com sequências exclusivas deste estudo, já que a região LSU ainda é inexistente no GenBank. No entanto, o clado “spinosa” necessita de melhores estudos avaliando sua posição filogenética, sendo proposto aqui uma nova variedade para os isolados de *H. spinosa* deste estudo, até que outras análises sejam realizadas com o clado (Figuras 21, 22).

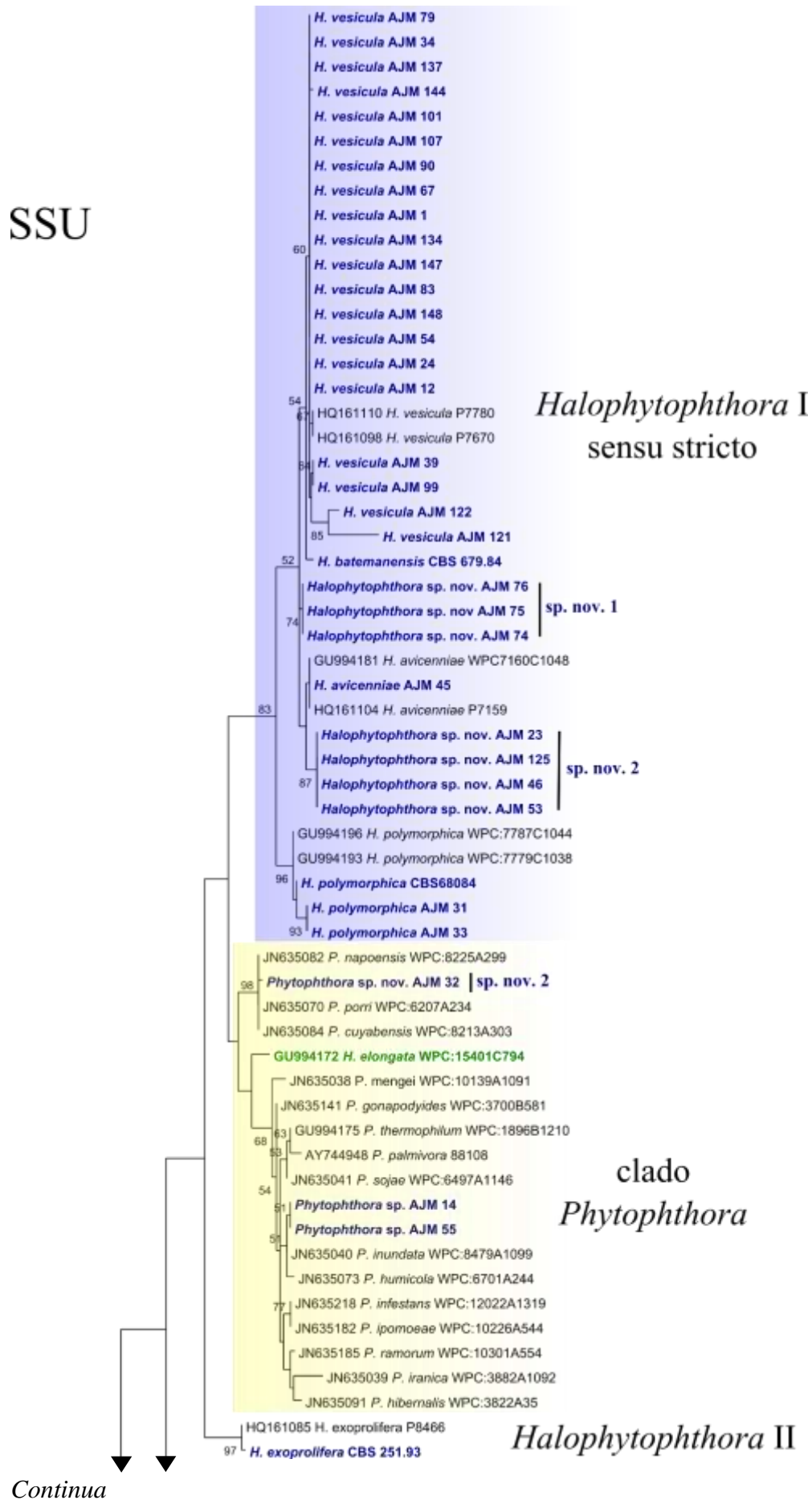
A análise de máxima verossimilhança da região ITS do gênero *Halophytophthora* (Figura 23) mostra o clado *Halophytophthora* sensu stricto bem suportado e composto pelas espécies *H. avicennae*, *H. batemanensis*, *H. fluviatilis*, *H. polymorphica*, *H. vesicula*, mais duas espécies isoladas na Alemanha (Nigrelli & Thines 2013) e outras duas propostas como novas neste estudo (*Halophytophthora* sp. nov. 1 e *Halophytophthora* sp. nov. 2).

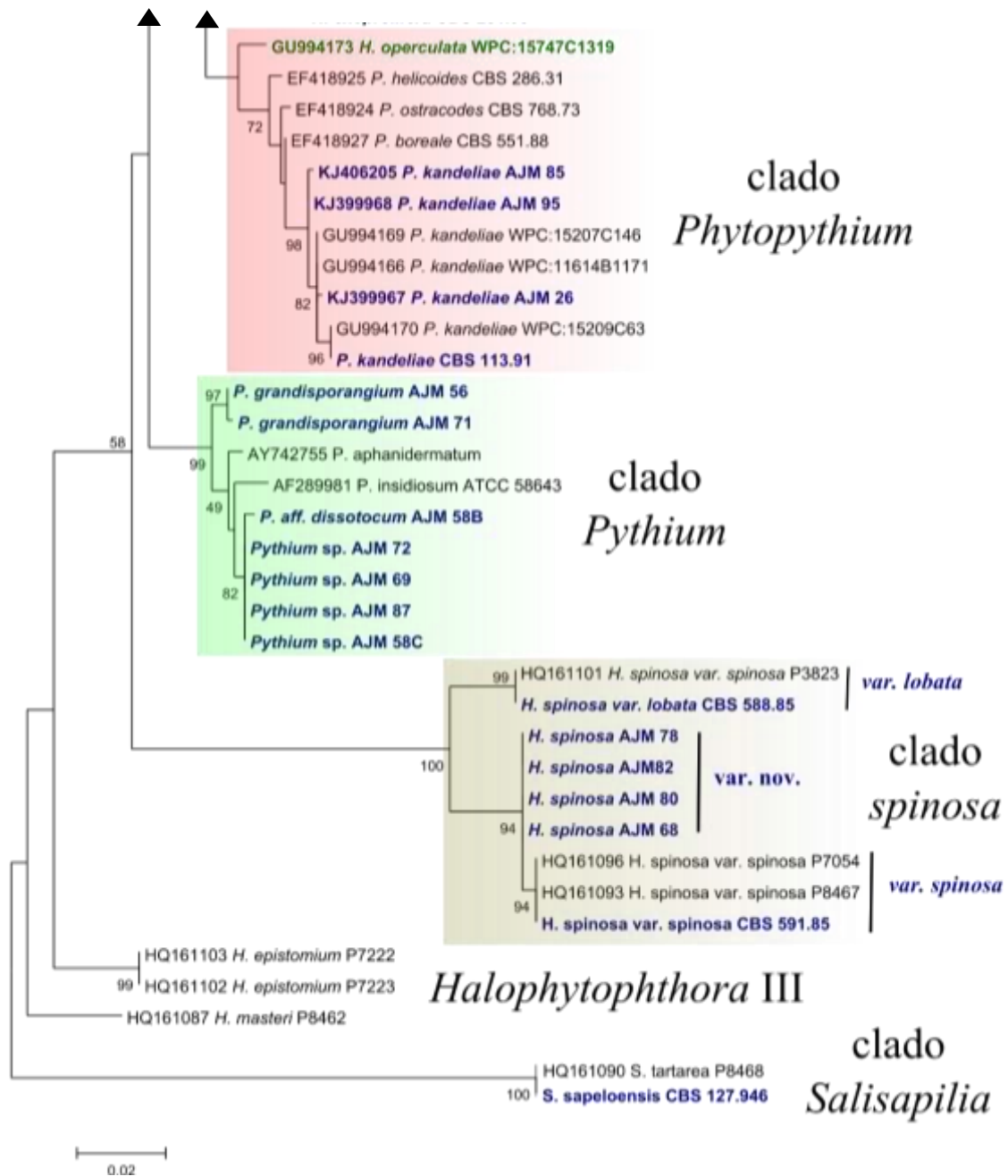
Embora a maior parte dos isolados de *Halophytophthora* deste estudo apresentem características morfológicas semelhantes a *H. batemanensis* e *H. vesicula*, análises moleculares das regiões SSU, ITS e LSU sugerem como duas novas espécies para o gênero (AJM 23, AJM 46, AJM 125 e AJM 74, AJM 75 e AJM 76). Os resultados obtidos deixam claro que as características morfológicas são insuficientes para distinção das espécies do gênero e que análises moleculares das regiões do rDNA é a única ferramenta capaz de distinguir as espécies.

Alguns dos isolados (AJM 14, AJM 21, AJM 32, AJM 41, AJM 55 e AJM 105), coletados em condições salinas (salinidade entre 0,8 e 2,5%), mostram-se bem suportados na análise de máxima verossimilhança da região ITS do gênero *Phytophthora* (Figura 24). Estes isolados apresentaram características morfológicas intermediárias entre *Halophytophthora* e *Phytophthora*, tais como a liberação dos zoósporos em uma vesícula semipersistente (como ocorre no gênero *Halophytophthora*) e proliferação interna dos zoosporângios (como ocorre no gênero *Phytophthora*). As análises realizadas sugerem estes isolados como duas possíveis novas para o gênero, estando os isolados AJM 14 e AJM 55 mais próximos de *Phytophthora humicola* e *P. inundata*. O gênero *Phytophthora*, mais conhecido como patógeno de grande importância econômica, é pouco relatado como saprofítico. As espécies saprofíticas em ecossistemas marinhos foram transferidas para um novo gênero por Ho & Jong (1990), o gênero *Halophytophthora*. Porém, os resultados aqui obtidos evidenciam nossos espécimes como novas espécies para o gênero, bem suportadas pelas análises moleculares. Além disto, *Halophytophthora elongata*, descrita por Ho & Chang (2003) de ecossistema marinho, também se encontra dentro do clado *Phytophthora* (Figura 21). Estes achados contradizem a necessidade de separação das espécies salinas de *Phytophthora* para *Halophytophthora*, sendo que as características que separam os gêneros devem ser revisadas.



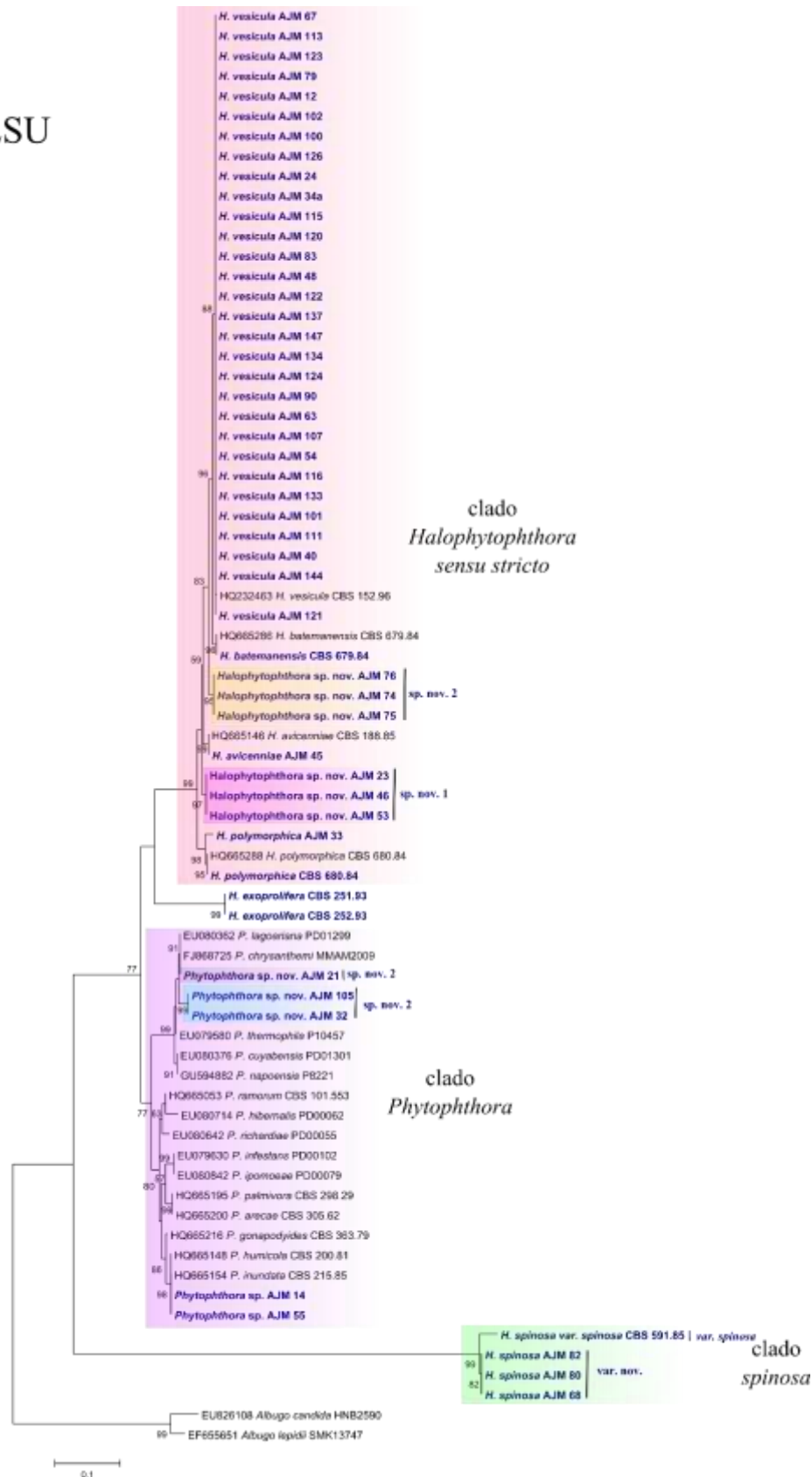
SSU



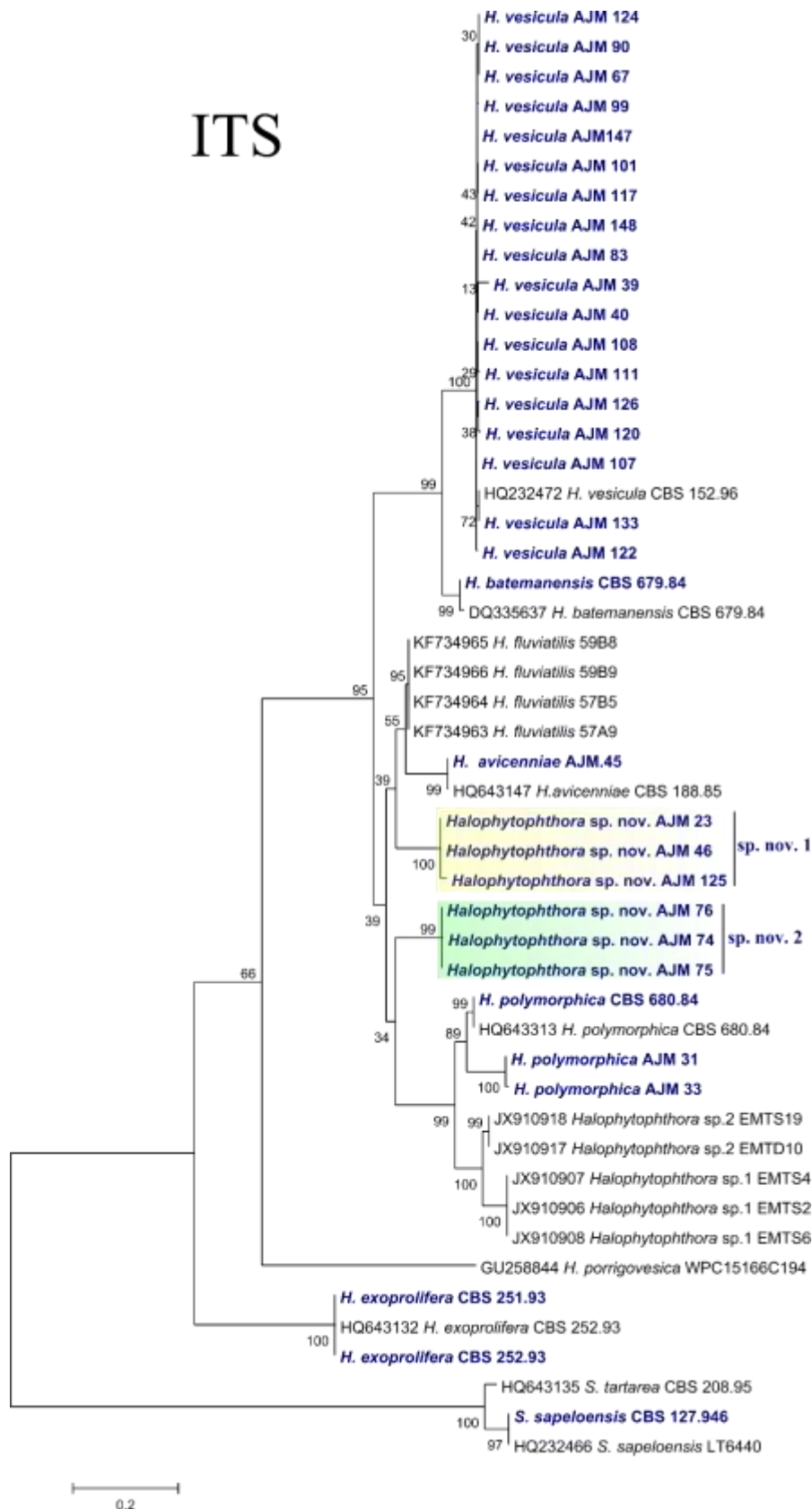


**Figura 21.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região SSU do rDNA de Peronosporales *sensu lato*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.

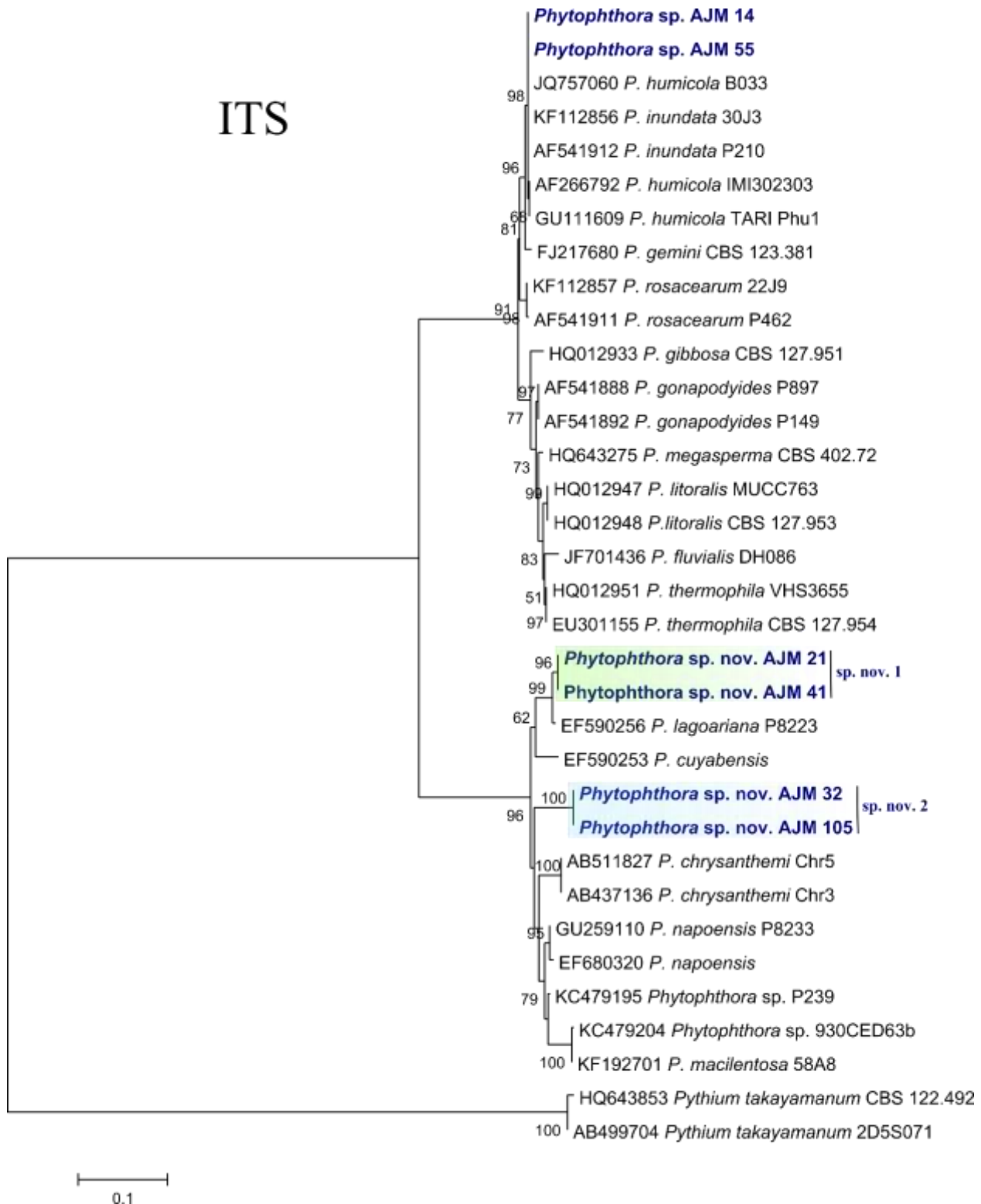
LSU



**Figura 22.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região LSU do rDNA de Peronosporales. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.



**Figura 23.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA do gênero *Halophytophthora*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.

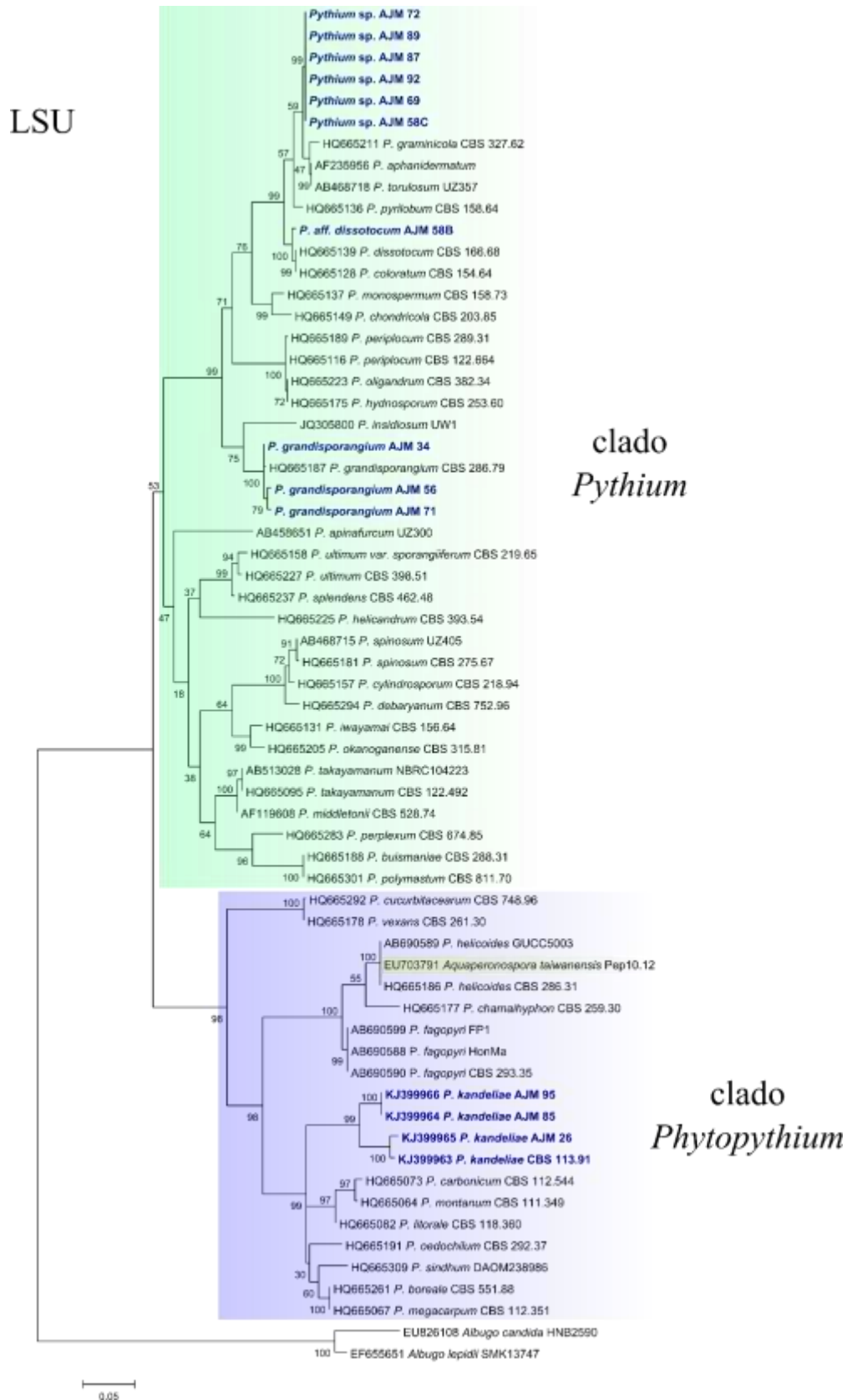


**Figura 24.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA do gênero *Phytophthora*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.

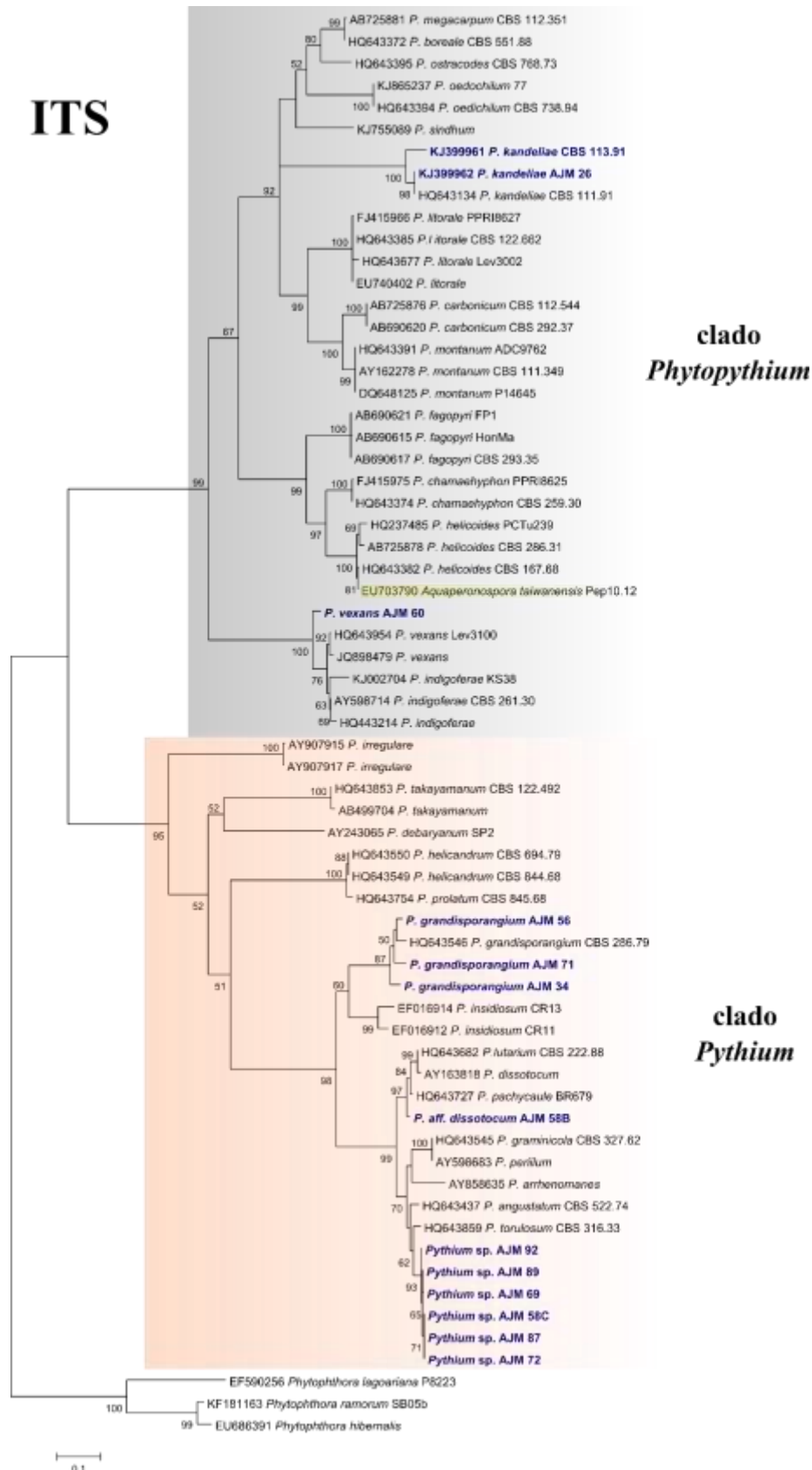
Os gêneros *Phytophythium* [*Pythium* clado K de Lévesque & de Cock (2004)] e *Pythium* apresentaram dois clados bem suportados nas análises de máxima verossimilhança das regiões LSU e ITS do rDNA (Figuras 25, 26). *Pythium grandisporangium*, citado pela primeira vez no Brasil, está mais relacionado com *P. insidiosum*, uma espécie parasita em mamíferos, inclusive o homem. As outras espécies de *Pythium* isoladas neste estudo se encontram bem suportadas no clado B do gênero *Pythium* [(espécies que possuem zoosporângios filamentosos conforme Lévesque & de Cock (2004)]. O isolado de *Pythium aff. dissotocum* embora bem suportado, apresentou diferenças filogenéticas com sequências de outros isolados da espécie disponíveis no GenBank, sendo mantida aqui como *P. aff. dissotocum*, apenas por compartilhar semelhanças morfológicas com a espécie. Os outros isolados, embora bem suportados juntamente com *Pythium monospermum*, espécie tipo do gênero, não puderam ser identificados em nível de espécie. Estes isolados também não formaram estruturas sexuais, imprescindíveis para identificação morfológica dos espécimes.

*Halophytophthora kandeliae* (AJM 26, AJM 85 e AJM 95), juntamente com o isolado da CBS 113.91, apresentaram características distintas do gênero *Halophytophthora*, agrupando-se no clado *Phytophythium* descrito por Bala *et al.* (2010) para abrigar as espécies do clado K de *Pythium*. O gênero é constituído por espécies intermediárias entre o gênero *Phytophthora* e *Pythium*, com várias espécies de *Pythium* sendo atualmente transferidas para o mesmo (de Cock *et al.* 2015). Diante disto foi proposta a transferência de *Halophytophthora kandeliae* para *Phytophythium kandeliae* (Marano *et al.* 2014b), no entanto, Thines (2014) havia anteriormente (janeiro/2014) proposto o mesmo num artigo sobre filogenia e evolução de oomicetos patogênicos. Marano *et al.* (2014c) então propuseram como sinonímia para evitar conflito em relação ao nome correto do autor da nova combinação.

Nas árvores de máxima verossimilhança das regiões LSU e ITS (Figuras 25, 26) ficou evidenciado que *Aquaperonospora taiwanensis*, espécie descrita por Ko *et al.* (2010) é na verdade um *Phytophythium helicoides*, o que é corroborado também por suas características morfológicas, necessitando ser transferida como sinonímia para o mesmo.



**Figura 25.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região LSU do rDNA de representantes de *Pythium* e *Phytopythium*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.



**Figura 26.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA de representantes de *Pythium* e *Phytophthora*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.



Os resultados das análises filogenéticas com os isolados de Peronosporales *sensu lato*, aponta que outros estudos necessitam ser realizados, principalmente para uma melhor compreensão da morfologia, ecologia e filogenia dos gêneros *Halophytophthora*, *Phytophthora*, *Phytopythium*, *Pythium* e *Salisapilia*, que estão intimamente relacionados.

#### 4.2. Ordem Saprolegniales

A ordem Saprolegniales, segundo a mais recente classificação de Oomycetes proposta por Beakes *et al.* 2014, possui três famílias: Achlyaceae, Saprolegniaceae e Verrucalvaceae. A família Achlyaceae foi proposta para agrupar espécies excêntricas dos gêneros *Achlya sensu stricto*, *Brevilegnia*, *Dictyuchus* e *Thraustotheca*. Estudos moleculares demonstram que *Achlya sensu lato* é parafilética (Leclerc *et al.* 2000, Spencer *et al.* 2002, Beakes *et al.* 2014), possuindo representantes com oósporos cêntricos, subcêntricos e excêntricos divididos em vários clados, tendo sido, por exemplo, *Achlya paradoxa* já transferida para o gênero *Protoachlya* por Coker (1923) e *Achlya apiculata*, *A. brasiliensis*, *A. curvicollis*, *A. megasperma*, *A. oblongata*, *A. oligacantha*, *A. pascuicola*, *A. polyandra*, *A. recurva*, *A. spinosa* e *A. stellata* transferidas formalmente para *Newbya* por Spencer *et al.* (2002) baseando-se na região SSU.

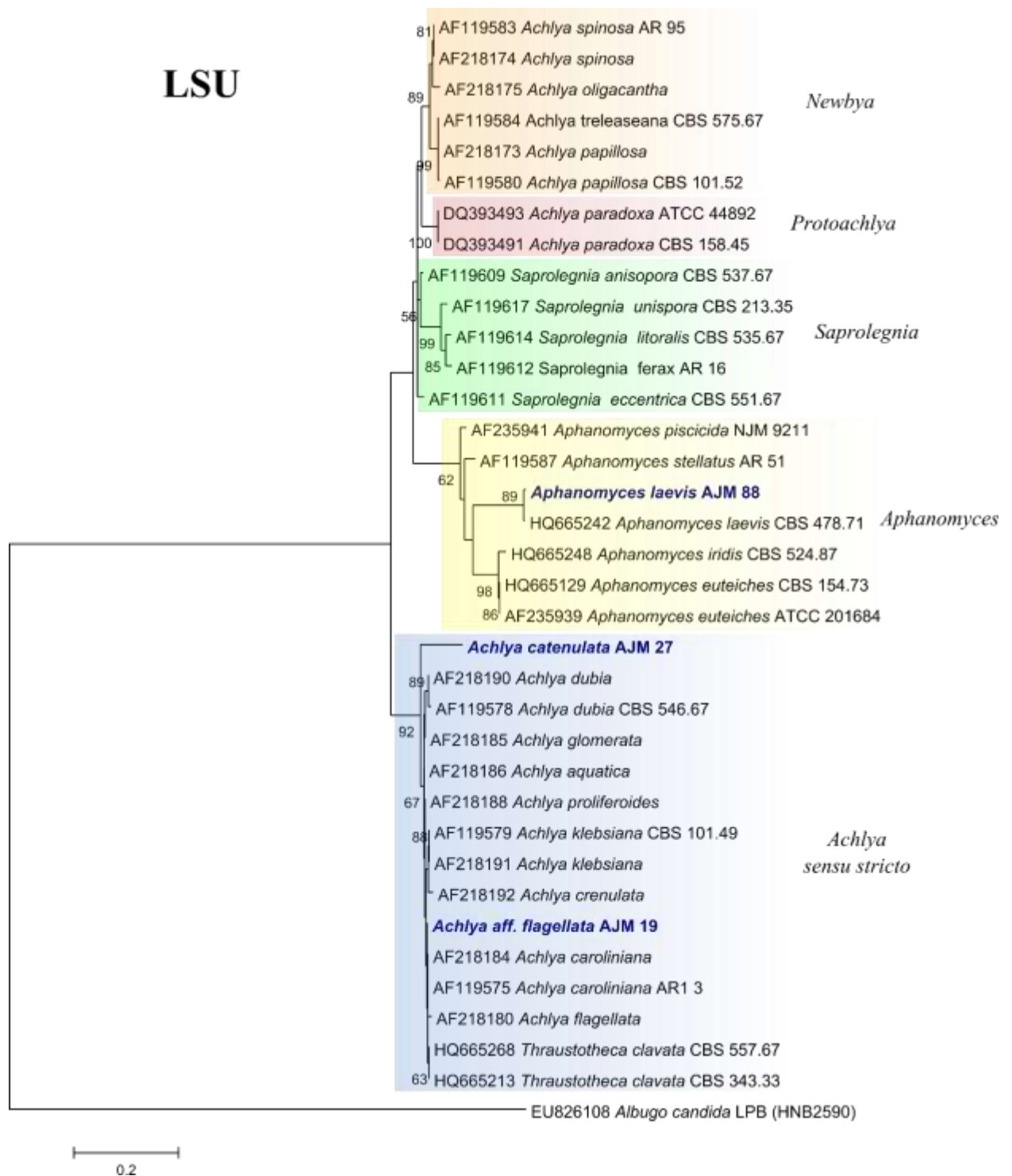
As análises de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA (Figura 27), utilizando sequências de representantes da ordem obtidas neste estudo e as disponibilizadas no GenBank, mostram o gênero *Achlya sensu lato* dividido em dois clados: o clado *Achlya sensu stricto* com espécies que possuem oósporos excêntricos juntamente com *Thraustotheca clavata*, como já mencionado anteriormente por Riethmüller *et al.* (1999), e o clado *Newbya* juntamente com *Achlya papillosa*, colocada em sinonímia com *A. recurva* por Spencer *et al.* (2002). A região ITS do rDNA (Figura 28) divide o gênero em dois clados: o clado *Achlya* I composto por espécies com oósporos excêntricos, *Achlya sensu stricto*, e *Achlya* II composto por espécies subcêntricas e cêntricas, juntamente com outras espécies subcêntricas e cêntricas já transferidas para *Newbya*, como mencionado acima.

Os isolados de *Achlya* obtidos neste estudo pertencem ao clado *Achlya sensu stricto*, sendo que *Achlya aff. flagellata* não está bem resolvida dentro do clado; no entanto, foi mantida por afinidade morfológica com a espécie. *Achlya klebsiana* está bem suportada dentro do clado. Até o presente momento não foi possível a identificação da *Achlya* sp. (AJM 118), pois não apresentou características morfológicas essenciais para a identificação em nível específico (estruturas sexuais) e também não apresentou identidade molecular com nenhuma das sequências disponíveis no GenBank.

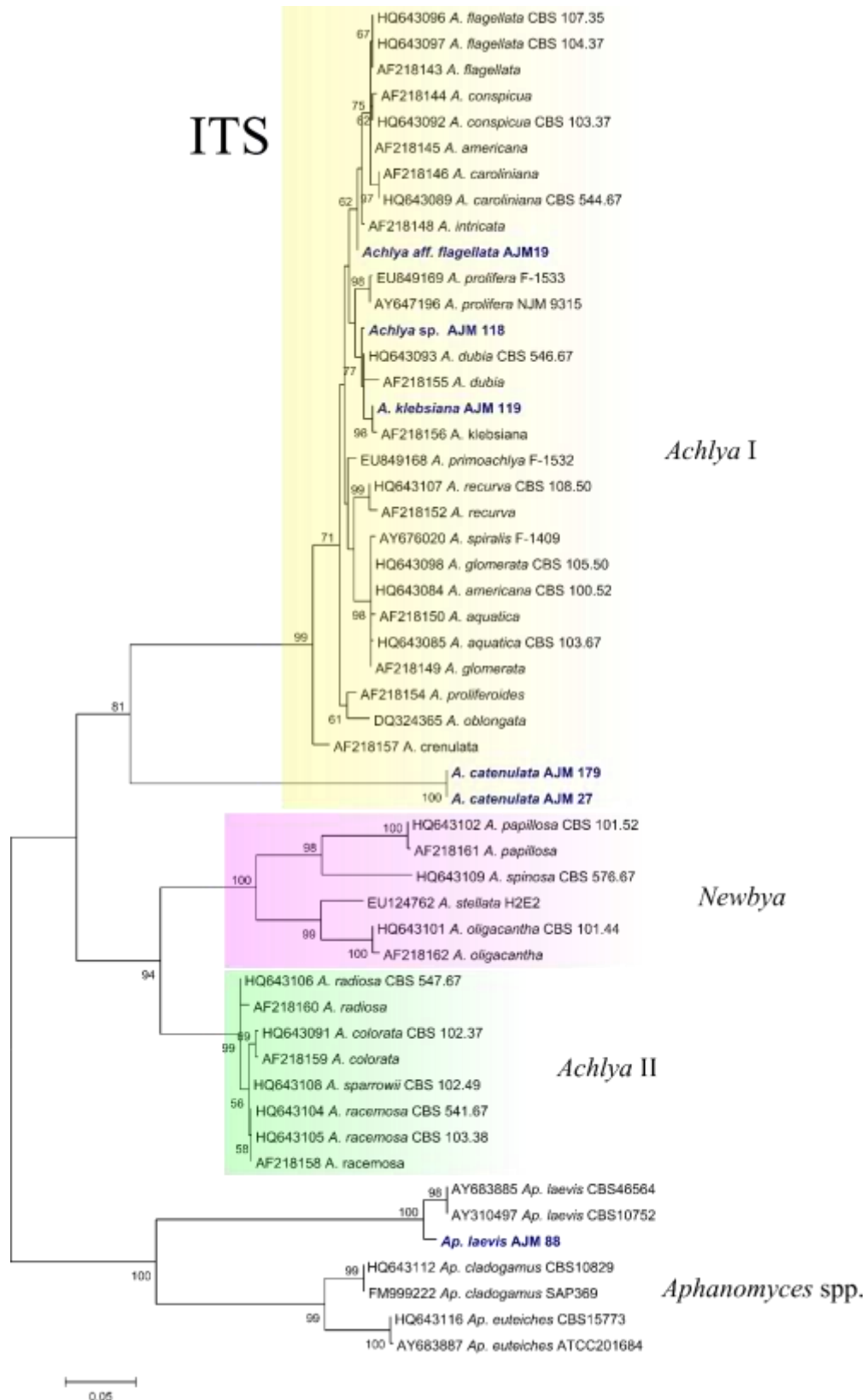
*Aphanomyces laevis* (AJM 88), pertencente à família Verrucalvaceae, foi identificado apenas por meio da análise molecular (Figura 28), pois o isolado não produziu estruturas sexuais essenciais para sua identificação em nível específico. Nas análises das regiões ITS e LSU do rDNA o isolado está bem suportado com outros isolados de *A. laevis* disponíveis no GenBank.

As análises das regiões LSU e ITS do rDNA (Figuras 27 e 28) obtidas possibilitaram também a proposição de uma nova espécie, a qual foi nomeada como *Achlya catenulata* pela presença de oogônios catenulados com até 11 oogônios, característica que não é encontrada em nenhuma outra espécie do gênero (Anexo III).

Outros estudos devem ser realizados com representantes de Saprolegniales, especialmente com outros gêneros parafiléticos, para melhor resolução dos clados dentro da ordem e para a efetivação das possíveis transferências ainda necessárias.



**Figura 27.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região LSU do rDNA de Saprolegniales. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.



**Figura 28.** Árvore de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA de *Achlya* e *Aphanomyces*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap (%) 1000 réplicas e na barra o número de substituições por sítio. Em azul as sequências obtidas neste estudo com isolados coletados no PEIC e isolados importados da CBS.

## CONCLUSÕES

Apesar dos oomicetos serem estudados no Brasil há muitos anos, este foi o primeiro estudo em área de manguezal, o qual evidenciou a riqueza em espécies no estado de São Paulo e no país. Das 14 espécies descritas para o gênero *Halophytophthora*, quatro são relatadas neste estudo, com todas as espécies do gênero *Halophytophthora* reportadas pela primeira vez no Brasil. As espécies *Phytopythium kandeliae* e *Pythium grandisporangium* também são citadas pela primeira vez no Brasil. Todas as espécies são novas citações para o PEIC.

Cinco das espécies identificadas são novas para a ciência (*Achlya catenulata*, duas espécies do gênero *Halophytophthora* e duas espécies do gênero *Phytophthora*), e uma variedade sendo considerada nova por meio das análises morfológicas e moleculares de diversas regiões gênicas.

Estudos morfológicos e moleculares devem ser realizados especialmente com os gêneros *Achlya*, *Halophytophthora*, *Phytophthora* e *Phytopythium*, os quais necessitam de uma profunda revisão.

O clado “spinosa” necessita de estudos mais aprofundados para se estabelecer a relação com o gênero *Halophytophthora*.

Os índices biológicos evidenciaram uma comunidade diversa e a distribuição uniforme dos táxons, não apresentando diferença significativa entre as amostras.

O estudo realizado contribui para o conhecimento da diversidade brasileira, ampliando sensivelmente a oferta de informação molecular de oomicetos e corrobora com a necessidade de preservação de áreas de Mata Atlântica, especialmente do ecossistema manguezal, este tão diverso e importante para a manutenção do fluxo de energia e produtividade nos ecossistemas estuarinos e marinhos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Anderson, R.A., Anderson, O.R., Barta, S.R., Bowser, S.S., Brogeroile, G., Fensome, R.A., Fredericq, S.** 2005. The new higher level classification of the eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399–451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F. W.** 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429–514.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. M.** 1996. *Introductory Mycology*. 4ed. John Wiley & Sons, New York.
- Anastasiou, C. J., Churchland, L. M.** 1969. Fungi on decaying leaves in marine habitats. *Canadian Journal of Botany* 47: 251–257.
- Ashton, E. C., Hogarth, P. J. & Ormond, R.** 1999. Breakdown of mangrove leaf litter in a managed mangrove forest in Peninsular Malaysia. *Hydrobiologia* 413: 77-88.
- Bala, K., Robideau, G. P., Lévesque, A., de Cock, A. W. A. M., Abad, Z. G., Lodhi, A. M., Shahzad, S., Ghaffar, A. & Coffey, M. D.** 2010. *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Levésque, sp. nov. *Persoonia* 24: 127–139.
- Barros, F., Melo, M. M. R. F., Chiea, S. A. C., Kirizawa, M., Wanderley, M. G. L. & Jung-Mendaçolli, S. L.** 1991. *Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso: caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes*. São Paulo. Hucitec.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., Sekimoto, S.** 2012. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” *Protoplasma* 249: 3–19.

- Beakes, G. W., Honda, D. & Thines, M.** 2014. Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *In: The Mycota VIII Part A.* McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 39-97.
- Beneke, E. S. & Rogers, L.** 1962. Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Paraná, Brazil. *Rickia* 1: 181-193.
- Bernardi, J. V. E., Landim, P. M. B., Barreto, C. L. & Monteiro, R. C.** 2005. Spatial study of the vegetation gradient from Cardoso Island State Park, SP, Brazil. *Holos Environment. Rio Claro* 5: 1-22.
- Campanili, M. & Prochnow, M.** 2006. Mata Atlântica -uma rede pela floresta. Brasília. RMA.
- Carvalho, P. C. T.** 1965. Microorganismos do solo associados as podridões dos toletes de cana-de-açúcar. *Revista de Agricultura* 40: 83-94.
- Cintron, G., Schaeffer-Novelli, Y. & Schaeffer-Novelli, G.** 1983. Mangrove Forests: Ecology and response to natural and man induced stressors. *UNESCO Reports in Marine Science* 23: 87-113.
- Coker, W. C.** 1923. The Saprolegniaceae, with notes on other water molds. University of North Carolina Press, Chapel Hill, pp. 201.
- Cunha-Lignon, M., Coelho, Jr. C., Almeida, R., Menghini, R. P., Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón, G. & Dahdouh-Guebas, F.** 2011. Characterisation of mangrove forest types in view of conservation and management: a review of mangals at the Cananéia region, São Paulo State, Brazil. *Journal of Coastal Research* 64: 349-353.
- de Cock, A.W.A.M.** 1986. Marine Pythiaceae from decaying seaweeds in the Netherlands. *Mycotaxon* 25: 101-110.
- de Cock A. W. A. M., Lodhi, A. M., Rintoul, T. L., Bala, K., Robideau, G. P., Abad, Z. G., Coffey, M. D., Shahzad, S., Lévesque, C. A.** 2015. Phytophythium: molecular phylogeny and systematics. *Personia* 34: 25–39.

- Fell, J. W. & Master, I. M.** 1973. Fungi associated with the degradation of mangrove (*Rhizophora mangle* L.) leaves in south Florida. *In: Estuarine Microbial Ecology*. Stevenson, L., Colwell, R.R. (eds.). Columbia: University of South Carolina Press, pp. 455-465.
- Fell, J. W. & Master, I. M.** 1975. Phycomycetes (*Phytophthora* spp. nov and *Pythium* sp. nov.) associated with decaying mangrove (*Rhizophora mangle*) leaves. *Canadian Journal of Botany* 53: 2908-2922.
- Figueiredo, M. B. & Pimentel, C. P. V.** 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica* 1: 299-302.
- Fuller, M. S. & Jaworski, A.** 1987. Zoosporic Fungi in teaching and research. Southeastern Publishing, Athens.
- Gerrettson-Cornell, L. & Simpson, J.** 1984. Three new marine *Phytophthora* species from New South Wales. *Mycotaxon* 19: 453-470.
- Gomes, A. L. & Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2006. Diversidade de Oomycota da Reserva Biológica de Paranapiacaba, Santo André, SP: primeiras citações para o Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 569-567.
- Gomes, A. L. & Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2008. Oomycota (Straminipila) da Reserva Biológica de Paranapiacaba. Santo André, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22: 373-392.
- Ho, H. H. & Jong, S. C.** 1990. *Halophytophthora*, gen. nov., a new member of the family Pythiaceae. *Mycotaxon* 36: 377-382.
- Ho, H. H., Chang, H. S. & Huang, S. H.** 2003. *Hyalophytophthora elongata*, a new marine species from Taiwan. *Mycotaxon* 85:417-422
- Ho, H. H., Chang, H. S., Hsieh, S. Y.** 1991. *Halophytophthora kandeliae*: a new marine fungus from Taiwan. *Mycologia* 83: 419-424.



- Jesus, A. L., Marano, A. V., Schoenlein-Crusius, I. H. & Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. *Hoehnea* 40: 167-180.
- Johnson, T. W. Jr.** 1956. The genus *Achlya*: morphology and taxonomy. University of Michigan Press, Michigan
- Johnson, Jr T. W., Seymour, R. L., Padgett, D. E.** 2002. Biology and systematics of Saprolegniaceae.
- Johnson, T. W., Sparrow, F. K.** 1961. Fungi in oceans and estuaries. Cramer: Weinheim.
- Kazutaka K. & Daron M.** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Disponibilizada em: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A.** 2008. Dictionary of Fungi (10th edition). Wallingford: CABI Bioscience.
- Ko W. H., Lin, M. J., Hu, C. Y. & Ann, P. J.** 2010. *Aquaperonospora taiwanensis* gen. et sp. nov. in Peronosphythoraceae of Peronosporales. *Botanical Studies* 51:343-350.
- Kohlmeyer, J & Kohlmeyer, E.** 1979. Marine mycology. The higher fungi. Academic Press, New York.
- Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T. & Marchand, C.** 2008. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. *Aquatic Botany* 89: 201-219.
- Kurokawa, K. & Tojo, M.** 2010. First record of *Pythium grandisporangium* in Japan. *Mycoscience* 51: 321-324.
- Lamour, K. H. & Finley, S; L.** 2006. A strategy for recovering high quality genomic DNA from a large number of Phytophthora isolates. *Mycologia* 98: 514-517.
- Lara, E. & Belbahri, L.** 2011. SSU rRNA reveals major trends in oomycete evolution. *Fungal Divers* 49: 93-100.

- Leaño, E. M., Vrijmoed, L. L. P. & Jones E. R. G.** 1998. Physiological studies on *Halophytophthora vesicula* (straminipilous fungi) isolated from fallen mangrove leaves from Mai Po, Hong Kong. *Botanica Marina* 41: 411-419.
- Leaño, E. M., Jones, E. B. G. & Vrijmoed, L. L. P.** 2000. Why are Halophytophthora species well adapted to mangrove habitats? In: Hyde, K.D., Ho, W.H., Pointing, S.B. (Eds.), *Aquatic Mycology across the Millennium. Fungal Diversity* 5, pp. 131–151.
- Leaño, E. M.** 2002. Ecology of straminipiles from mangrove habitats. *In: Fungi in Marine Environments*. Hyde, K. D. (eds.). Hong Kong: Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 111-134.
- Leclerc, M. C., Guillot, J. & Deville, M.** 2000. Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie von Leeuwenhoek* 77: 369-377.
- Lévesque, C. A. & de Cock, A. W. A. M.** 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108: 1363-1383.
- Luz, E. D. M. N., Silva, S. D. M., Bezerra, J. L., Souza, J. T. de, Santos, A. F. dos.** 2008. Glossário ilustrativo de Phytophthora: técnica especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna:FAPESB/CEPLAC.
- Magurran, A. E.** 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton: Princeton University Press.
- Marano, A. V. & Steciow, M. M.** 2006. Metodología para el análisis cuali-cuantitativo de comunidades de hongos zoospóricos. *Actas del XX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (CD-ROM)*.
- Marano, A. V., Barrera, M. D., Steciow, M. M., Donadelli, J. L. & Saparrat, C. M. N.** 2008. Frequency, abundance and distribution of zoosporic organisms from Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina). *Mycologia* 100: 691-700.

- Marano, A. V., Pires-Zottarelli, C. L. A., Barrera, M. D., Steciow, M. M. & Gleason, F. H.** 2011a. Diversity, role in decomposition and succession of zoosporic fungi and straminipiles on submerged decaying leaves in a woodland stream. *Hydrobiologia* 659: 93-109.
- Marano, A. V., Barrera, M. D., Steciow, M. M., Gleason, F. H., Pires-Zottarelli, C. L. A. & Donadelli, J. L.** 2011b. Diversity of zoosporic true fungi and heterotrophic stramenopiles in Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina): assemblages colonizing baits. *Fundamental and Applied Limnology* 178: 203-218.
- Marano, A. V., Pires-Zottarelli C. L. A., Gleason F. H., Neuhauser S. & Steciow M. M.** 2011c. Assemblages of zoosporic true fungi, heterotrophic straminipiles and plasmodiophorids in freshwater ecosystems. *In: Aquatic Ecosystems Series*. Browne, S.A. (eds). New York: Nova Publishers.
- Marano, A. V., Pires-Zottarelli, C. L. A., de Souza, J. I., Glockling, S. L., Leño, E., Gachon, C. M. M., Strittmatter, M. & Gleason, F. H.** 2012. Hyphochytriomycota, Oomycota and Perkinsozoa (Supergroup Chromoalveolata). *In: Marine Mycology*. Jones E.B.G., Pang K.L. (eds.). Berlin: Walter De Gruyter GMBH & Co.
- Marano, A. V., Jesus, A. L., Pires-Zottarelli, C. L. A., James, T. Y., Gleason, F. H., de Souza, J. I.** 2014a. Phylogenetic relationships of Pythiales and Peronosporales (Oomycetes, Straminipila) within the “peronosporalean galaxy”. *In: Gareth Jones EB, Hyde KD, Pang K-L (eds.). Freshwater fungi*. de Gruyter: Germany.
- Marano, A. V., Jesus, A. L., de Souza, J. I., Leño, E. M., James, T. Y., Jerônimo, G. H., de Cock, A. W. A. M., PiresZottarelli, C. L. A.** 2014b. A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5 (4): 510-522.
- Marano, A. V., Jesus, A. L., de Souza, J. I., Jerônimo, G. H., PiresZottarelli, C. L. A.** 2014c. On the status of *Phytophthium kandeliae* comb. nov. (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5 (5): 662–664

- Middleton, B. A., McKee, K. L.** 2001. Degradation of mangrove tissues and implications for peat formation in Belizean island forests. *Journal of Ecology* 89: 818-828.
- Milanez, A. I. & Trufem, S. B. F.** 1981. Ficomictos em frutos submersos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. *Rickia* 9: 7-15.
- Milanez, A. I. & Trufem, S. B. F.** 1984. Fungos zoospóricos em frutos submersos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. *Rickia* 11: 77-84.
- Milanez, A. I., Pires-Zottarelli, C. L. A. & Schoenlein-Crusius, I. H.** 1994a. Fungos aquáticos da região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Academia de Ciências do Estado de São Paulo* 2: 142-149.
- Milanez, A. I., Pires-Zottarelli, C. L. A. & Schoenlein-Crusius, I. H.** 1994b. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 1. Monoblepharidales. *Hoehnea* 21: 157-161.
- Milanez, A. I., Pires-Zottarelli, C. L. A. & Schoenlein-Crusius, I. H.** 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 5: Leptomitales (Rhipidiaceae). *Hoehnea* 23: 67-76.
- Milanez, A. I., Pires-Zottarelli, C. L. A., Schoenlein-Crusius, I. H. & Lohmann, L. G.** 2003. Criptógamos do “Parque Estadual das Fontes do Ipiranga”, São Paulo, SP. Fungos, 8: Blastocladiales. *Hoehnea* 30: 21-29.
- Miranda, M. L. & Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2008. O gênero *Pythium* no Parque Estadual da Serra da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea* 35: 281-288.
- Miranda, M. L. & Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2012. Oomicetos do Parque Estadual da Serra da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea* 39: 95-112.
- Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W. Brooks, T. M. & Gascon, C.** 2011. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. *In: Zachos FE, Habel JC (eds) Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas.* Springer, Heidelberg.

- Moore-Landecker, E.** 1996. Fundamentals of the fungi. New Jersey: Prentice Hall Inc, p. 574.
- Nakagiri, A.** 2000. Ecology and diversity of *Halophytophthora* species. Fungal Diversity 5: 153-164.
- Nakagiri, A.** 2002. Diversity and phylogeny of *Halophytophthora* (Oomycetes). Abstracts 7th International Mycology Congress Oslo 55, pp. 19.
- Nakagiri, A.** 1993. Growth and reproduction of *Halophytophthora* species. Transactions of the Mycological Society Japan 34: 87-99.
- Nakagiri, A.** 2012. Culture collections and maintenance of marine fungi. *In: Marine Mycology.* Jones E.B.G., Pang K.L. (eds.). Berlin: Walter De Gruyter GMBH & Co, pp. 501-507.
- Nakagiri, A., Tokumasu, S., Araki, H., Koreeda, S. & Tubaki, K.** 1989. Succession of fungi in decomposing mangrove leaves in Japan. *In: Recent Advances in Microbial Ecology* (eds). Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R., Uchida, A.. Tokyo: Japan Scientific Society Press, pp. 297-301.
- Nascimento, C. A., Gomes, E. P. C. & Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2011. Occurrence and distribution of zoosporic organisms in water bodies from Brazilian Cerrado areas. Mycologia 103: 261-272.
- Negreiros, O. C., Carvalho, C. T., Cesar, S. F., Duarte, F. R., Deshler, W. O. & Thelen, K. D.** 1974. Plano de manejo para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso. São Paulo: Boletim Técnico do Instituto Florestal, pp. 1-57.
- Neuhauser, S., Glockling, S. L., Leño, E. M., Lilje, O., Marano, A. V. & Gleason, F. H.** 2012. Na introduction to fungus-like microorganisms. *In: Marine Fungi and Fungal-Like Organisms.* Jones, E. B. G. and Pang, K. L. (eds.). De Gruyter, Berlin, Germany, pp. 137-151.
- Newell, S.Y.** 1976. Mangrove fungi: The succession in the mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings. *In: Recent Advances in aquatic Mycology.* Gareth Jones, E.B. (ed.). London: Elek Science, pp. 51-91.
- Newell, S.Y. & Fell, I.W.** 1992. Distribution and experimental responses to substrate of marine oomycetes (*Halophytophthora* spp.) in mangrove ecosystem. Mycological Research 96: 851-856.

- Newell, S.Y. & Fell, J.W.** 1997. Competition among mangrove oomycetes, and between oomycetes and other microbes. *Aquatic Microbial Ecology* 12: 21-28.
- Newell, S.Y., Miller, J.D. & Fell, J.W.** 1987. Rapid and pervasive occupation of fallen mangrove leaves by marine zoosporic fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2464-2469.
- Nigrelli, L. & Thines, M.** 2013. Tropical oomycetes in the German Bight Climate warming or overlooked diversity? *Fungal Ecology* 6: 152-160.
- Odum, W. E. & Heald, E. J.** 1975. Mangrove forests and aquatic productivity. *In: HASLER, A.O.* (ed.). An introduction to land-water interactions. Berlin: Springer-Verlag, pp. 129-136.
- Oliveira, A. B.** 2009. Decomposição das folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* em um manguezal de Ilhéus, Bahia. Ilhéus: UESC.
- Padgett, D. E.** 1978. Observations on estuarine distribution of Saprolegniaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 70: 141-143.
- Pires-Zottarelli, C. L. A., Milanez, A. I., Schoenlein-Crusius, I. H. & Lohmann, L. G.** 1995. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 3: Peronosporales (Pythiaceae). *Hoehnea* 22: 125-133.
- Pires-Zottarelli, C. L. A., Milanez, A. I., Schoenlein-Crusius, I. H. & Lohmann, L. G.** 1996a. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 6: Chytridiales. *Hoehnea* 23: 77-90.
- Pires-Zottarelli, C. L. A., Milanez, A. I., Schoenlein-Crusius, I. H. & Lohmann, L. G.** 1996b. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 4: Saprolegniales. *Hoehnea* 23: 39-66.
- Pires-Zottarelli, C. L. A. & Rocha, M.** 2007. Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 125-136.
- Plaats-Niterink, A. J. Van der.** 1981. Monograph of genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21: 1-42.

- Raghukumar, S., Sathe, P. V., Sharma, S., Raghukumar C.** 1995. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. III. Field studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata*. *Aquatic Microbiology Ecology* 9: 117-125.
- Robideau, G. P., de Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C. H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B. & Lévesque, A. C.** 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular and Ecological Resources* 11: 1002-1011.
- Robideau, G. P., Rodrigue, N. & Lévesque C. A.** 2014. Codon based phylogenetics introduces novel flagellar gene markers to oomycete systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 279-291.
- Rocha, M. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2002. Chytridiomycota e Oomycota da “Represa do Guarapiranga”, São Paulo, SP. *Acta Botanica Brasilica* 16: 287-309.
- Rogers, A.L., Milanez, A.I. & Beneke, E.S.** 1970. Additional aquatic fungi from São Paulo State. *Rickia* 5: 93-110.
- Riethmüller, A., Weiß, M. & Oberwinkler, F.** 1999. Phylogenetic studies of Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77: 1790-1800.
- Schoenlein-Crusius, I. H. & Milanez, A. I.** 1998. Fungos zoospóricos (Mastigomycotina) da Mata Atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, município de Santo André, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 21:177-181.
- Schoenlein-Crusius, I. H., Pires-Zottarelli, C. L. A. & Milanez, A. I.** 1992. Aquatic fungi in leaves submerged in a stream in the Atlantic rainforest. *Revista de Microbiologia* 23:167-171.
- Sessegolo, G. C. & Lana, P. C.** 1991. Decomposition of *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana* leaves in a mangrove of Paranaguá Bay (Southeastern Brazil). *Botanica Marina* 34: 285-289.

- Silva, C. J., Sanches, L., Bleich, M. E., Lobo, F. A., Nogueira, J. S.** 2007. Produção de serrapilheira no Cerrado e Floresta de transição Amazonia-Cerrado do centro-oeste brasileiro. *Acta Amazônica*. Manaus 37: 543-548.
- Souza, T. A. B., Clemente, G., Moura, F., Garcia, F. & Flynn M.** 2006. Mapeamento de manguezal em Cananéia, São Paulo, Brasil. *Environmental and Health World Congress*: 691-692.
- Sparrow Jr, F.K.** 1960. *Aquatic Phycomycetes* (2nd ed.). Ann Arbor: University of Michigan Press.
- Sparrow Jr, F.K.** 1968. Ecology of freshwater fungi. *In: The Fungi*. G. C. Ainsworth and A. S. Sussman (eds.). Academic Press. New York, pp. 41-93.
- Spencer, M. A., Vick, M. C. & Dick, M. W.** 2002. Revision of *Aplanopsis*, *Pythiopsis*, and ‘subcentric’ *Achlya* species (Saprolegniaceae) using 18S rDNA and morphological data. *Mycological Research* 106: 549-560.
- Tabarelli, M., Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. & Bedé, L.** 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade* 1: 132-138.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tan T. K., Pek C. L.** 1997. Tropical mangrove leaf litter fungi in Singapore with an emphasis on Halophytophthora. *Mycological Research* 101: 165-168.
- Thines, M.** 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes - a global overview. *European Journal of Plant Pathology* 138: 431-447.
- Thomas, G. & Clay, D.** 2005. BIODAP: Ecological diversity and its measurement. Resource Conservation. Fundy National Park. New Brunswick, Canada.
- Yang, X. & Hong, C.X.** 2014. *Halophytophthora fluviatilis* sp. nov. from freshwater in Virginia. *FEMS Microbiology. Letters* 352: 230-237.



# ANEXOS

**Anexo I.** Comparação da abundância e composição de espécies entre as amostras de folhas (*Rhizophora mangle* e *Laguncularis racemosa*) segundo o teste de post-hoc Mann-Whitney.

Diferenças significativas  $p < 0,05$ .

	<i>R.</i> <i>mangle</i>	<i>L.</i> <i>racemosa</i>
<i>R.</i> <i>mangle</i>		0,6248
<i>L.</i> <i>racemosa</i>	0,6248	

**Anexo II.** Comparação da abundância e composição de espécies entre as diferentes salinidades nas amostras de folhas (*Rhizophora mangle* e *Laguncularis racemosa*) segundo o teste de post-hoc Mann-Whitney. Diferenças significativas  $p < 0,05$ . S0%= 0,05; S1%=0,8; S2%=1,6; S3%=2,8%; S4=3% de salinidade.

		<i>R. mangle</i>					<i>L. racemosa</i>				
		S0	S1	S2	S3	S4	S0	S1	S2	S3	S4
<i>R. mangle</i>	S0		0,35	0,88	0,57	0,8	0,65	0,63	0,57	0,88	0,95
	S1	0,35		0,5	0,75	0,29	0,18	0,66	0,76	0,49	0,42
	S2	0,88	0,5		0,65	0,8	0,56	0,76	0,65	0,98	1
	S3	0,57	0,75	0,65		0,46	0,33	0,91	0,98	0,71	0,63
	S4	0,8	0,29	0,8	0,46		0,91	0,53	0,46	0,7	0,8
<i>L. racemosa</i>	S0	0,65	0,18	0,56	0,33	0,91		0,35	0,33	0,56	0,61
	S1	0,63	0,66	0,76	0,91	0,53	0,35		0,91	0,8	0,71
	S2	0,57	0,76	0,65	0,98	0,46	0,33	0,91		0,71	0,63
	S3	0,88	0,49	0,98	0,71	0,7	0,56	0,8	0,71		0,95
	S4	0,95	0,42	1	0,63	0,8	0,61	0,71	0,63	0,95	

**Anexo III.** Artigo aceito para publicação na revista *Phytotaxa* (maio/2015)

***Achlya catenulata* sp. nov., a new Saprolegniales (Oomycetes, Straminipila) from Brazilian mangrove swamp**

ANA LUCIA DE JESUS<sup>1,3</sup>, AGOSTINA V. MARANO<sup>1</sup>, JOSÉ I. DE SOUZA<sup>1</sup>, TIMOTHY Y. JAMES<sup>2</sup>, GUSTAVO H. JERÔNIMO<sup>1</sup>, SARAH C. O. ROCHA<sup>1</sup>, DANILO R. GONÇALVES<sup>1</sup>, MARCELA C. BORO<sup>1</sup> & CARMEN L. A. PIRES-ZOTTARELLI<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Department of Ecology and Evolution, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA*

<sup>3</sup> E-mail *analuciajesus@hotmail.com*

**Abstract**

*Achlya catenulata* sp. nov. was collected from water samples in a mangrove swamp of the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso”, São Paulo State, Brazil. This new species is characterized by the presence of achlyoid type of zoospore discharge from both primary and secondary sporangia, catenulate smooth-walled oogonia in chains of up to 11 oogonia, declinuous antheridial branches and eccentric oospores, which generally failed to mature. Maximum likelihood phylogenetic analyses based on the ITS and LSU regions (rDNA) placed this species within the *Achlya sensu stricto* clade.

**Key words:** catenulate oogonia, eccentric oospores, ITS and LSU phylogeny, Oomycota, taxonomy

**Introduction**

The genus *Achlya* Nees belongs to Saprolegniales, a representative order of Oomycetes which are commonly found as saprobes on plants and animal debris in freshwater and terrestrial habitats (Dick 2001, Johnson *et al.* 2002, Shearer *et al.* 2007). Some species can also be etiologic agents of diseases of freshwater fishes and crustaceans, with some reports of pathogens in plants roots (Willoughby 2003, Marano *et al.* 2011, Beakes *et al.* 2014). Molecular studies showed that this order forms a well-supported monophyletic clade, however, the families and genera have been reorganized (Dick *et al.* 1999, Spencer *et al.* 2002, Beakes & Sekimoto 2009, Beakes *et al.* 2014). More recently, Beakes *et al.* (2014) proposed Achlyaceae fam. nov. which aggregates four genera, *Achlya sensu stricto*, *Brevilegnia*, *Dictyuchus* and *Thraustotheca*, all with eccentric oospores in the “achlyoid/thraustothecoid clade”. Currently, the family Saprolegniaceae *sensu stricto* is composed by species producing centric/subcentric oospores in the genera *Aplanes*, *Aplanopsis*, *Calyptralegnia*, *Newbya*, *Protoachlya*, *Pythiopsis* and *Saprolegnia*, and the Verrucalvaceae by *Aphanomyces*, *Aquastella*, *Pachymetra*, *Plectospira*, *Sommerstorffia* and *Verrucalvus*. The taxonomical position of the genus *Leptolegnia* is still uncertain. This genus has been previously included in both Leptolegniaceae and Saprolegniaceae (Dick *et al.* 1999, Petersen & Rosendahl 2000, Johnson *et al.* 2002) and therefore needs additional studies in order to elucidate its phylogenetic position.

*Achlya* has approximately 50 valid species (Johnson *et al.* 2002, El Androusse *et al.* 2006, Paul & Steciow, 2008, Kirk *et al.* 2008). Historically, this genus has been divided into different groups or sub-genera (Coker 1923, Johnson 1956) showing the morphological plasticity in its species. Molecular studies showing that *Achlya sensu lato* is polyphyletic have been increased in the last few years (Riethmüller *et al.* 1999, Leclerc *et al.* 2000, Dick 2001, Spencer *et al.* 2002, Beakes *et al.* 2014). Based on SSU (rDNA) phylogenetic analyses Spencer *et al.* (2002) transferred to *Newbya* gen. nov. the species with centric and subcentric oospores and laterally attached antheridia, which formed a monophyletic clade and were previously segregated from *Achlya* (Dick 1973). Other species of

*Achlya* with both cymose and internal proliferation of the zoosporangia and motile and nonmotile spores on emerging were transferred to *Protoachlya* (Coker 1923, Johnson *et al.* 2005).

Our new species was isolated from water samples in a mangrove swamp of the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso”, Cananéia, São Paulo State, Brazil. Its main diagnostic character is the presence of catenulate oogonia in chains of up to 11 oogonia, which is not found in any other known species of *Achlya*. Maximum likelihood phylogenetic analyses of the ITS and LSU regions (rDNA) grouped our two isolates in a well-defined and supported subclade within the *Achlya sensu stricto* clade.

## Material & Methods

### *Study area*

The “Parque Estadual da Ilha do Cardoso” (PEIC) (25°03'05''-25°18'18''S; 47°53'48''-48°05'42''W) is situated in Cananéia municipality, São Paulo State, Brazil. It is a preserved fragment of Atlantic Rainforest area that contains different types of vegetation, including tropical forest, “restinga” (mainly composed by grasses, lichens, bromeliads and shrubs), dunes and mangroves areas with several water bodies like waterfalls, streams and rivers (Barros *et al.* 1991).

### *Sampling and laboratory analysis*

Water samples with vegetal and animal debris were collected in August 2012 and June 2013 at Perequê River and in a permanent nearby lagoon (2.8 % salinity). In the laboratory, aliquots (30 mL) of water samples were plated and baited with *Sorghum* sp. seeds (Sparrow 1960, Milanez 1989). Plates were incubated at room temperature (20°–22° C) for five days. After incubation, baits were observed under the microscope and the specimens yielding visible of Oomycetes isolated. The two isolates of *Achlya* were purified on MP<sub>5</sub> (Beneke & Rogers 1962). Asexual and sexual structures were characterized and measured in water cultures ( $n=50$ ). The specimens were preserved and deposited at the CCIBt culture collection (“Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica”, São Paulo, SP, Brazil) and MMBF culture collection (“Micoteca Mário Barreto Figueiredo”) belonging to WFCC (World Federation for Culture Collections). Dried culture vouchers (Wu *et al.* 2004) were deposited in the Herbarium SP.

### *DNA extraction, PCR amplification and sequencing*

Mycelium for DNA extraction was obtained by cultivating each isolate in three 2 mL microfuge tubes containing 1 mL of MP<sub>5</sub> liquid medium with 0.5 gL<sup>-1</sup> of streptomycin sulphate and penicillin G. After incubation for 5-10 d at 25 °C, the mycelium was harvested by centrifugation at 13000 rpm for 15 min in order to obtain mycelial pellets. The mycelial pellets of the three replicates were aseptically combined in order to obtain enough biomass for DNA extraction. The supernatants were discarded and 1 mL of sterile reverse-osmosis water was added to the tubes followed by vortexing at 2500 rpm. The tubes were again centrifuged and the supernatant discarded. Pellets were treated according to the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). The ITS1-5.8S-ITS2 and LSU regions were amplified using the primers ITS4/ITS6 (Cooke *et al.* 2000) and LR0R/LR6-O (Riethmüller *et al.* 2002), respectively. DNA was amplified with the PCR SuperMix kit (Invitrogen ®) for a final volume of 25 µl in a C1000 Touch™ Thermal Cycler Bio-Rad following the conditions described by Marano *et al.* (2014). Amplicons were purified with AxyPrep PCR Clean-up kit (Axygen®). Sequencing was performed using the same PCR primers and also with UN-up18S42 and UN-lo28S22 for ITS (Robideau *et al.* 2011) and LSURint for LSU (Coffey *et al.* 2011), in an ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™).

### *Salinity tests*

The growth (colony diameter) of both specimens isolated from fresh and saline water were tested on solid MP<sub>5</sub> culture medium prepared using different dilutions of reverse-osmosis water and filtered and autoclaved seawater to obtain the salinities of 0.0 (without seawater), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 % (only seawater). Dishes were incubated at 21 °C for 96 h and the diameters of the colonies measured with a millimeter rule.

### *Phylogenetic analysis*

For phylogenetic reconstruction, the ITS and LSU rDNA sequences of *Achlya* (Table 1) were compared with published sequences of other species of *Achlya sensu lato* deposited in GenBank, using *Aphanomyces* spp. as outgroup. Sequences were aligned using MAFFT, and the ambiguously aligned characters removed manually. The Maximum Likelihood (ML) phylogenies for each region were created in MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) using Hasegawa-Kishino-Yano + G for LSU and Tamura 3-parameter + G for ITS as the best nucleotide substitution models, and bootstrap support of 1,000 pseudo-replicates.

### *Results*

#### **Taxonomy**

*Achlya catenulata* C.L.A Pires-Zottarelli, A.L. Jesus, A.V. Marano & J.I. de Souza, *sp. nov.* (Fig. 1A–E)

MB 811033

Holotype:—BRAZIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolated from saline water, 29 August 2012, SP465830 (dried culture), CCIBt 4029 and MMBF 01/15.

Ex-type:—BRAZIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolated from freshwater, 04 June 2013, SP465831 (dried culture), CCIBt 4030 and MMBF 02/15.

Monoecious. Mycelium dense; hyphae slender, sparingly branched. Sporangia abundant; fusiform or clavate; straight; renewed sympodially; 230–460 × 20–30 µm. Spores discharge and behavior achlyoid; spore cluster persisting at exit orifice; encysted primary cysts 7.5–12.5 µm diam. Gemmae present, some catenulate. Oogonia abundant, terminal or lateral; catenulate, chains of up to 11 oogonia, sometimes simple; obpyriform, 35.0–82.5 × 27.5–57.5 µm. Oogonial wall pitted under region of attachment of the antheridial cells; smooth. Oogonial stalks straight, 1–2½ times the diameter of the oogonium in length. Oospores generally not maturing. Oospores eccentric; spherical; 1–3 (–5) per oogonium, and never filling it; 15–35 µm diam.; germination not observed. Antheridial branches declinous; slender; frequently branched; persisting. Antheridial cell tubular or clavate; simple or branched; attached apically, laterally or by projections; fertilization tube present, persisting.

**Etymology**:—“*catenulata*” refers to the presence of catenulate oogonia.

**Specimens examined**—BRAZIL. São Paulo: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, from a permanent lagoon at a mangrove swamp, 29 August 2012 (CCIBt 4029); Perequê river, 04 June 2013 (CCIBt 4030).

**Culture growth**—Colony without special pattern and limited growth. Growth of the isolates after 96 h at 21 °C: (i) CCIBt 4029: on MP<sub>5</sub> without salt: 2.2 cm; on MP<sub>5</sub> with 0.5 % of salt: 2.5 cm; on MP<sub>5</sub> with 1.0 % of salt: 1.4 cm; on MP<sub>5</sub> with 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 % of salt: no growth was observed; (ii) CCIBt 4030: on MP<sub>5</sub> without salt: 2.0 cm; on MP<sub>5</sub> with 0.5 % of salt: 2.6 cm; on MP<sub>5</sub> with 1.0 % of salt: 1.2 cm; on MP<sub>5</sub> with 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 % of salt: no growth was observed.

**Notes**:—Both isolates grew on *Sorghum* sp. seeds used as bait forming a limited two-week colony (1 cm). The zoosporangia are abundant and the zoospore discharge is exclusively achlyoid (from both

primary and secondary zoosporangia) with persistent spore clusters at the exit pore (Fig. 1A), renewed sympodially (Fig. 1B). Gemmae are mainly produced in old cultures. Oogonia are formed abundantly in a catenulate fashion after two weeks (Fig. 1C). The oospores commonly failed to mature but when they mature are eccentric (Figs. 1D, 1E). The antheridial branches are exclusively declinous and persistent (Fig. 1C). The isolates grew in solid culture media with a salinity range of 0.0–1.0 %. Although the isolate CCIBt 4029 was collected from nearly seawater conditions (2.8 % salinity), it did not grow in culture medium with higher saline concentrations than 1.0 %. The saline water was collected in a mangrove swamp where salt concentrations fluctuate throughout the day. Therefore, it might be able to tolerate saline conditions to some degree but it might not be able to grow and sporulate under these conditions.

### ***Phylogenetic placement***

Our ITS and LSU phylogenies of *Achlya sensu lato* showed two major clades (Figs. 2, 3): the *Achlya sensu stricto* clade (with eccentric oospores), which was strongly supported (100% and 99% branch support for ITS and LSU, respectively) and the clade composed by species of *Achlya* with centric/subcentric oospores. Our two isolates of *Achlya catenulata* form a well-defined and supported subclade (100% and 99% branch support for ITS and LSU, respectively) within the *Achlya sensu stricto* clade. Both trees showed that the clade composed by species with centric/subcentric oospores (46 % and 72 % of branch support for ITS and LSU, respectively) is divided into two subclades: a) composed by two species of *Achlya* transferred to *Protoachlya* (100 % and 99 % branch support for ITS and LSU, respectively), *P. paradoxa* (Coker 1923) and *P. hypogyna* (Johnson *et al.* 2005) and b) composed by species of *Achlya* transferred to *Newbya* (Spencer *et al.* 2002), supported by 77% and 73% of branch support for ITS LSU, respectively. Unfortunately, species of *Achlya* are still not well-represented in the GenBank database, especially in the case of the species that were transferred to *Newbya*.

### **Discussion**

The results of our salinity tests with the two isolates of *Achlya catenulata* are in agreement with the scarce data published on salinity tolerance in species of Saprolegniales. Padgett (1978) recovered some species of Saprolegniaceae *sensu lato* (*Achlya americana* Humphrey, *A. flagellata* Coker, *Achlya* sp., *Saprolegnia australis* R.F. Elliott, *Saprolegnia* sp. and *Dictyuchus* sp.) from North Carolina estuaries using *in situ* baiting with hemp seeds. He concluded that species of Saprolegniales *sensu lato* can tolerate high salinity conditions in nature only if at some time during the tidal cycle the salinity drops below a minimum value. This might explain why some species are found as fish pathogens in estuaries (Dykstra *et al.* 1986, Noga *et al.* 1988, Shafer *et al.* 1990, Fraser *et al.* 2006, Noga & Dykstra 1986). Nevertheless, some authors observed that high salinities might suppress the sexual reproduction in members of Saprolegniaceae *sensu lato* (Höhnk 1952, 1953, Harrison & Jones 1975).

*Achlya catenulata* does not share significant morphological similarities with any of the already described species of *Achlya sensu stricto* which is evidenced by the phylogenetic position of the isolates. However, the spores discharge and behavior achlyoid of them led to our decision to propose as a new species into the genus *Achlya*. Our results confirmed previous observations which indicated that *Achlya sensu lato* is polyphyletic and that the type of oospore (centric/subcentric *vs.* eccentric) is a character of relevance in the taxonomy of Saprolegniales. Further studies are necessary in order to elucidate the position of the other species of *Achlya sensu lato*.

### **Acknowledgments**

We are indebted to “Instituto Florestal” for the permission given to collect samples at “Ilha do Cardoso”, Cananéia, São Paulo, SP and to Manoel Osorio Neves Junior for his valuable help during sampling. We also wish to thank FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”) for the financial support given to C.L.A. Pires-Zotarelli (Process N°. 2012/50222-7) and for the fellowship given to A.L. Jesus (Process N°. 2013/01409-0), CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”) for the fellowship and support given to A.V. Marano (“Ciência Sem Fronteiras” Program, “Atração Jovens Talentos” DRI- CAPES Process N°. 006/2012). CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is also acknowledged for the grant given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N°. 304411/2012-4).

## References

- Barros, F., Melo, M.M.R.F., Chiea, S.A.C., Kirizawa, M., Wanderley, M.G.L., Jung-Mendaçolli, S.L. (1991) Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso: caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes. *Boletim do Instituto de Botânica* 1: 1–184.
- Beakes, G.W. & Sekimoto, S. (2009) The evolutionary phylogeny of oomycetes - insights gained from studies of holocarpic parasites of algae and invertebrates. *In: Lamour, K. & Kamoun, S. (eds.) Oomycete Genetics and Genomics*. John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 1–24.
- Beakes, G.W., Honda, D. & Thines, M. (2014) Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *In: The Mycota VIII Part A*. McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 39–97.
- Beneke, E.S. & Rogers, L. (1962) Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Paraná, Brazil. *Rickia* 1: 181–193.
- Coffey, M.D., Huss, J., Peiman, M. (2011) *Molecular phylogeny of the marine Halophytophthora species: a work in progress*. Available from: [www.phytophthoradb.org/pdf/O11Coffey230.pdf](http://www.phytophthoradb.org/pdf/O11Coffey230.pdf) (accessed: 20 Oct 2014).
- Coker, W.C. (1923) *The Saprolegniaceae, with notes on other water molds*. University of North Carolina Press, Chapel Hill, 201 pp.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. & Brasier, C.M. (2000) A molecular phylogeny of Phytophthora and related Oomycetes. *Fungal Genetic Biology* 30: 17–32.
- Dick, M.W. (1973) Saprolegniales. *In: Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS (eds.). The Fungi: an advanced treatise*. Academic Press Inc., New York, pp. 113–144.
- Dick, M.W., Vick, M.C., Gibbings, J.G., Hedderson, T.A. & Lopez-Lastra, C.C. (1999) 18S rDNA for species of *Leptolegnia* and other Peronosporomycetes: justification for the subclass taxa Saprolegniomycetidae and Peronosporomycetidae and division of the Saprolegniaceae sensu lato into the families Leptolegniaceae and Saprolegniaceae. *Mycological Research* 103: 1119–1125.
- Dick, M.W. (2001) *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 670 pp.
- Dykstra, M.J., Noga, E.J., Levine, J.F. & Moye, D.W. (1986) Characterization of the *Aphanomyces* species involved with ulcerative mycosis in Menhaden. *Mycologia* 78: 664–672.
- El Androusse, A., El Aissami, A. & Paul, B. (2006) *Achlya abortispora*, a new oomycete isolated from water samples taken from a water reservoir in Morocco. *Current Microbiology* 53: 60–67.
- Fraser, G.C., Callinan, R.B. & Calder, L.M. (2006) *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *Journal of Fish Diseases* 15: 173–181
- Harrison, J.L. & Jones, E.B.G. (1975) The effect of salinity on sexual and asexual sporulation of members of the Saprolegniaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 65: 389–394.
- Höhnk, W. (1952) Die in Nordwestdeutschland gefunden ufer- und boden bewohnenden Saprolegniaceae. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven* 1: 52–90.
- Höhnk, W. (1953) Studien zur Brack- und Seewassermykologie II. Oomycetes: Zweter Teil. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven* 2: 52–108.

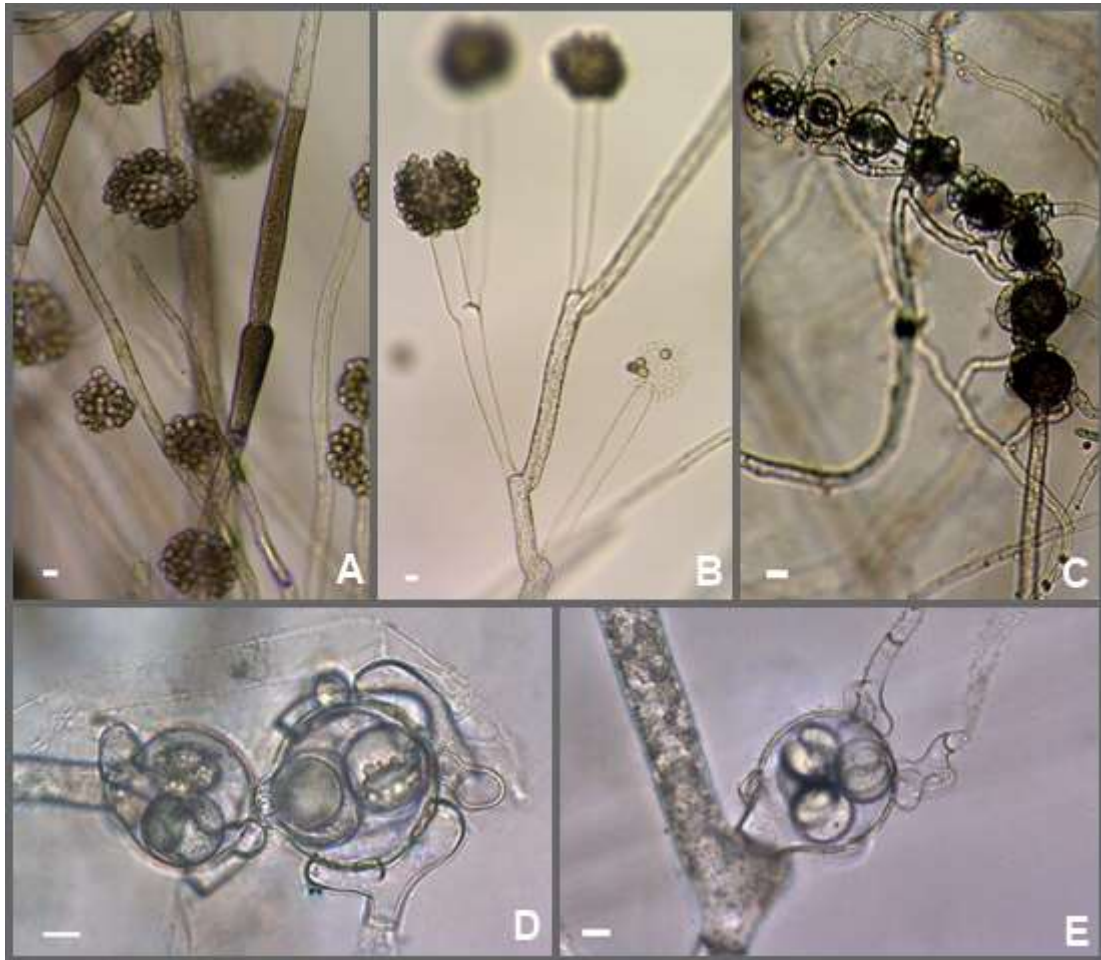
- Johnson, T.W. Jr. (1956) *The genus Achlya: morphology and taxonomy*. University of Michigan Press, Michigan, 180 pp.
- Johnson, T.W. Jr, Seymour, R.L. & Padgett, D.E. (2002) *Biology and systematics of Saprolegniaceae*. Available from: <http://dl.uncw.edu/digilib/biology/fungi/taxonomy%20and%20systematics/padgett%20book/> (accessed: 15 September 2014).
- Johnson, T.W. Jr, Seymour, R.L. & Padgett, D.E. (2005) Systematics of the Saprolegniaceae: new combinations. *Mycotaxon* 92: 11–32.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (2008) *Dictionary of Fungi*. CABI Bioscience, Wallingford, 771 pp.
- Leclerc, M.C., Guillot, J. & Deville, M. (2000) Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie von Leeuwenhoek* 77: 369–377.
- Marano, A.V., Pires-Zottarelli, C.L.A., Gleason, F.H., Neuhauser, S. & Steciow, M.M. (2011) Assemblages of zoosporic true fungi, heterotrophic straminipiles and plasmodiophorids in freshwater ecosystems. In: *Aquatic Ecosystems Series*. Browne SA (ed.). Nova Publishers, New York, pp. 1–55.
- Marano, A.V., Jesus, A.L., de Souza, J.I., Leão, E.M., James, T.Y., Jerônimo, G.H., de Cock, A.W.A.W. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2014) A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5: 510–522.
- Milanez, A.I. (1989) Fungos de águas continentais. In: Fidalgo, O. & Bononi V.L. (eds.). *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 17–20.
- Noga, E.J., Levine, J.F., Dykstra, M.J. & Hawkis, J.H. (1988) Pathology of ulcerative mycosis in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* 4: 189–197.
- Noga, E.J. & Dykstra, M.J. (1986) Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *Journal of Fish Diseases* 9: 47–53.
- Padgett, D.E. (1978) Observations on estuarine distribution of Saprolegniaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 70: 141–143.
- Paul, B & Steciow, M.M. (2008) *Achlya spiralis*, a new aquatic oomycete with bent oogonial stalks, isolated from the Burgundian region of France. *FEMS Microbiological Letters* 284: 120–125.
- Petersen, A.B. & Rosendahl, S. (2000) Phylogeny of the Peronosporomycetes (Oomycota) based on partial sequences of the large ribosomal subunit (LSU rDNA). *Mycological Research* 104: 1295–1303.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94: 834–849.
- Riethmüller, A., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (1999) Phylogenetic studies of Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DAN sequences. *Canadian Journal of Botany* 77: 1790–1800.
- Robideau, G.P., de Cock, A.W.A.M., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C.H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B. & Lévesque, A.C. (2011) DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular and Ecological Resources* 11: 1002–1011.
- Shafer, T.H., Padgett, D.E. & Celio, D.A. (1990) Evidence for enhanced salinity tolerance of a suspected fungal pathogens of Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus* Latrobe. *Journal of Fish Diseases* 13: 335–344.
- Sparrow, F.K. Jr. (1960) *Aquatic Phycomycetes*. The University Michigan Press, Michigan, 1187p.



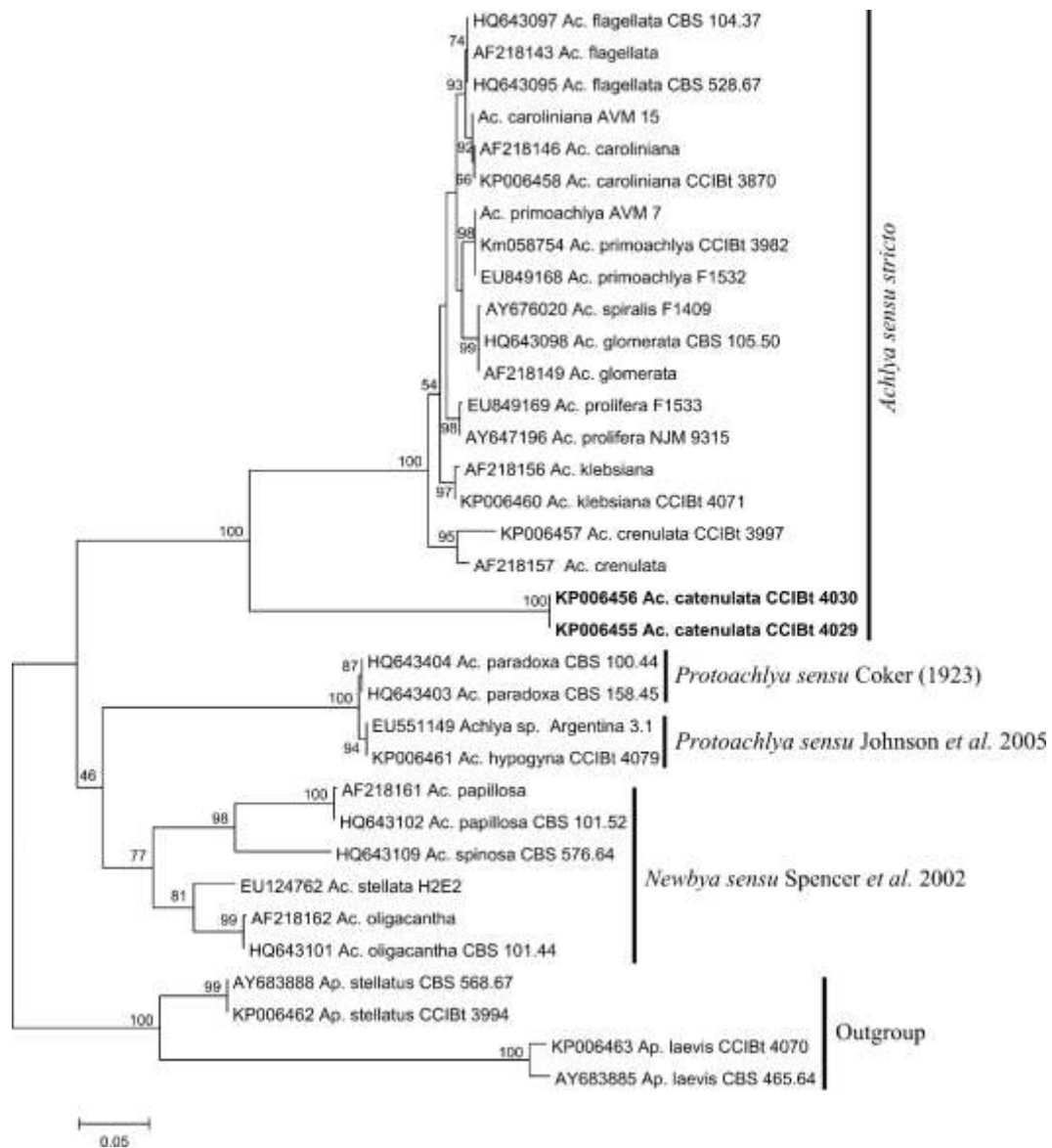
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thorton, H.A. & Voglymayr, H. (2007) Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* 16: 49–67.
- Spencer, M.A., Vick, M.C. & Dick, M.W. (2002) Revision of *Aplanopsis*, *Pythiopsis*, and ‘subcentric’ *Achlya* species (Saprolegniaceae) using 18S rDNA and morphological data. *Mycological Research* 106: 549–560.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Willoughby, L.G. (2003) Diseases of freshwater fishes. In: Tsui CKM, Hyde KD (eds.). *Freshwater Mycology*. Fungal Diversity Press, China, pp. 111–126.
- Wu, Q. (Florence), Thiers, B.M. & Pfister, D.H. (2004) Preparation, preservation and use of fungal specimens in Herbaria. In: Muller, G.M., Bills, G.F. & Foster, M.S. *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 23–36.

**TABLE 1.** Origin, CCIBt culture collection number and GenBank accession number of the isolates of *Achlya* sequenced in this study. NA: not available

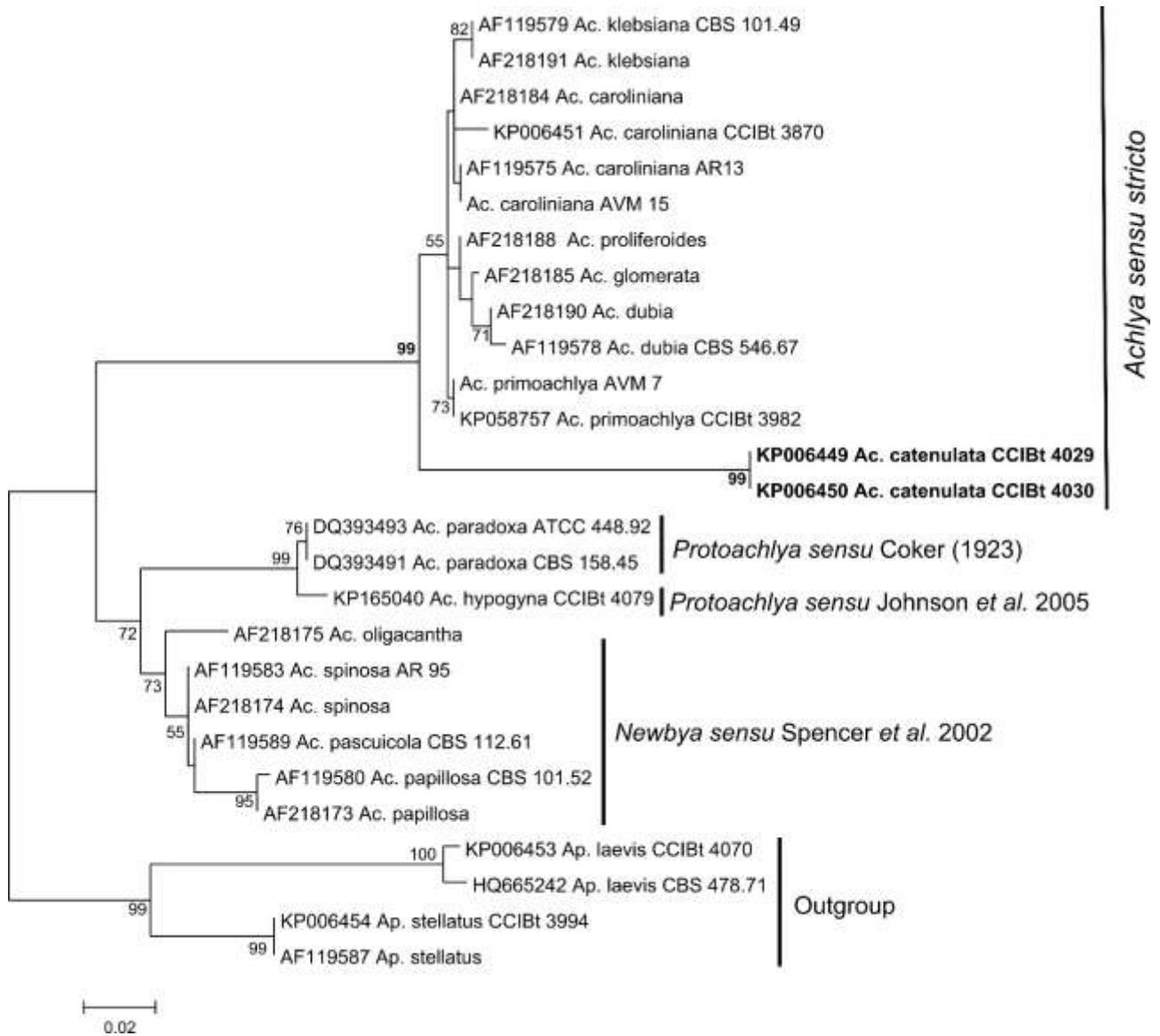
Taxa	Isolate Origin			GenBank Accession Number	
	CCIBt Number	Samples	Collection area	ITS	LSU
<i>Achlya caroliniana</i>	3870	Soil	PEIC	KP006458	KP006451
<i>Achlya catenulata</i>	4029	Saline water	PEIC	KP006455	KP006449
<i>Achlya catenulata</i>	4030	Freshwater	PEIC	KP006456	KP006450
<i>Achlya crenulata</i>	3997	Freshwater	PEIC	KP006457	NA
<i>Achlya hypogyna</i>	4079	Hydroponic nutrient solution	Itapecerica da Serra (Brazil)	KP006461	KP165040
<i>Achlya klebsiana</i>	4071	Freshwater	PEIC	KP006460	NA
<i>Achlya primoachlya</i>	3982	Freshwater	PEIC	KM058754	KM058757
<i>Aphanomyces laevis</i>	4070	Freshwater	PEIC	KP006463	KP006453
<i>Aphanomyces stellatus</i>	3994	Freshwater	PEIC	KP006462	KP006454



**FIGURE 1 A–E.** *Achlya catenulata*. A. Achlyoid discharge of the zoosporangia. B. Sympodial renewal of the zoosporangia. C. Catenulate oogonia and diclinous antheridia. D – E. Oogonia, failed to mature and eccentric oospores and antheridia. Bars: 10 μm



**FIGURE 2.** Maximum likelihood tree inferred from ITS rDNA sequences of isolates of *Achlya*. Numbers next to branches indicate bootstrap support (%) and the bar shows the number of substitutions per site.



**FIGURE 3.** Maximum likelihood tree inferred from LSU rDNA sequences of isolates of *Achlya*. Numbers next to branches indicate bootstrap support (%) and the bar shows the number of substitutions per site.