

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**Cristiane Biasi**

**FATORES REGULADORES DA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR: UMA  
ABORDAGEM SOBRE FRAGMENTADORES E DECOMPOSITORES**

**Santa Maria, RS  
2017**



**Cristiane Biasi**

**FATORES REGULADORES DA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR: UMA ABORDAGEM  
SOBRE FRAGMENTADORES E DECOMPOSITORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, RS, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas – Área Biodiversidade Animal**.

**Orientador: Prof. Sandro Santos**  
**Coorientador: Prof. Luiz Ubiratan Hepp**

**Santa Maria, RS**  
**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biasi, Cristiane

Fatores reguladores da decomposição foliar: uma abordagem sobre fragmentadores e decompositores / Cristiane Biasi.- 2017.

150 p.; 30 cm

Orientador: Sandro Santos

Coorientador: Luiz Ubiratan Hepp

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2017

1. Aegla longirostri 2. Hifomicetos 3. Enriquecimento de nutrientes 4. Phylloicus 5. Vegetação ripária I. Santos, Sandro II. Hepp, Luiz Ubiratan III. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Cristiane Biasi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: cristiane.biasi@gmail.com

**Cristiane Biasi**

**FATORES REGULADORES DA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR: UMA ABORDAGEM  
SOBRE FRAGMENTADORES E DECOMPOSITORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biodiversidade Animal, da Universidade  
Federal de Santa Maria – UFSM, RS, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Ciências Biológicas – Área  
Biodiversidade Animal**

**Aprovada em 21 de Fevereiro de 2017:**

---

**Sandro Santos, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

---

**Marcelo da Silva Moretti, Dr. (UVV-ES)**

---

**Rozane Maria Restello, Dra. (URI-RS)**

---

**Edélti Albertoni, Dra. (FURG)**

---

**Carla Bender Kotzian, Dra. (UFSM)**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2017**



## AGRADECIMENTOS

Uma caminhada que perdurou 4 anos foi acompanhada de muitos tropeços, muitas vitórias e muito aprendizado. Não estive sozinha em nenhum destes momentos, por isso chegou a hora de agradecer a todos que estiveram comigo nesta jornada até aqui.

Agradeço primariamente ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria pela infraestrutura e recursos para o desenvolvimento dessa tese. Agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa durante o doutorado-sanduíche em Coimbra, Portugal. Agradeço ao secretário do PPG em Biodiversidade Animal, Sidnei Cruz, pelo auxílio prestado durante a realização do doutorado. Também agradeço ao Sr. Graciano Sonego, que permitiu que coletássemos os animais em sua propriedade.

Agradeço aos membros da banca, Dr. Marcelo da Silva Moretti, Dra. Edélti Albertoni, Dra. Rozane Maria Restello e Dra. Carla Bender Kotzian pela prontidão em contribuir para a avaliação deste trabalho.

### *Aos meus orientadores*

Obrigada Professor Dr. Sandro Santos por me receber ainda em 2011 em seu laboratório, e confiar em meu trabalho. Obrigada pela paciência e por me apoiar nas mudanças do projeto, toda vez que algo dava errado. Obrigada pelos ensinamentos nestes 6 anos que fui sua orientada!

Obrigada ao Professor Dr. Luiz Hepp, meu co-orientador, que faz parte de minha vida acadêmica desde a graduação, que recebeu uma aluna quieta, sem experiência em seu laboratório em meados de 2006. Sem dúvidas cheguei até aqui por me espelhar nos melhores!

### *Aos colegas e amigos*

Agradeço aos lacrustianos que, mais do que colegas, são amigos que sempre estiveram prontos para ajudar um ao outro. Obrigada pelos almoços no RU, pelos tickets dos bombons da Lalah e pelas paçocas (nham)! Sinto orgulho de pertencer a este grupo que me acolheu tão bem e que me animou nas junções que fazíamos (e que sinto saudade!). Obrigada Bianca, Amanda, Ju, Joele, Beto, Diogo, Fernandinho de Nóbrega, Cícero, Cris II, Marcelo II. Obrigada Alexandre, pela amizade que aprendi a respeitar muito, pelas piadas de humor negro (rsrs) e por toda a ajuda. Obrigada Marcelo, pelas conversas sobre os mais variados temas, por ser essa pessoa correta e que sempre está pronta para ajudar.

Obrigada Gláucia, Cláudio e Bob por me receberem em sua casa sempre que precisei, pelas jantãs, pelos chimãs na praça, pelas inúmeras caronas. Obrigada por me ajudarem no momento difícil que passei em agosto de 2014. Acho que ainda não agradei o suficiente, mas espero que minha amizade seja uma boa forma de retribuir. Glau, obrigada por tudo, pelas parcerias nos trabalhos, pelas centenas de discos cortados e experimentos repetidos. Você é uma grande amiga!

#### *Aos amigos de Coimbra*

Agradeço muito ao Professor Dr. Manuel Graça por me aceitar em seu laboratório e compartilhar seu imenso conhecimento comigo, durante meu período de doutorado-sanduiche. Pude conviver com uma das referências bibliográficas mais importantes e respeitadas na área, que sempre encontrava solução para os imprevistos que a ciência nos traz. Agradeço à Verónica, que me ensinou muito mais do que eu poderia imaginar, és uma pesquisadora de mão cheia e sempre disposta a orientar. Às demais colegas de laboratório, Maria João, Melissa e Olimpia, obrigada pela receptividade. Obrigada à Claudia Caro e à Mariângela Spadoto pela amizade que fizemos e que prometemos um dia nos reencontrar.

#### *À minha família*

Palavras não são suficientes para agradecer aos meus familiares. Minha mãe Ana e meu pai Miro, meus orgulhos e minha calma quando preciso. Obrigada por me apoiarem em todas as minhas decisões e cuidarem tão bem do Rabitinho. Agradeço minha irmã Cristina e meu cunhado Marciano por toda a ajuda, pelas inúmeras caronas até a rodoviária para que eu pegasse algum ônibus para algum lugar, pois minha vida foi assim, sempre para cá e para lá. E o mais importante, obrigada por nos presentear com a pessoinha mais importante para nossa família, que é o Murilinho. Obrigada ao Murilinho também, pois mesmo não sabendo, enchia meu coração de alegria a cada foto e a cada encontro. Amo vocês!

Agradeço ao meu amor, Junior, pelos 11 anos juntos até agora. A vida ficou mais fácil desde que nos conhecemos, pois sempre contei com seu amor. Agradeço por estar presente em minha vida quando morei em Erechim, Santa Maria, quando nos unimos em São Leopoldo e nessa nova empreitada que é Panambi. Obrigada por todo o apoio, por todo o amor, por toda a paciência, por fazer parte de minha vida. Hoje construímos algo que é muito precioso para mim. E que venham as compotas ☺! Te amo!



*“He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada”*

Gabriel García Márquez



## RESUMO

### FATORES REGULADORES DA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR: UMA ABORDAGEM SOBRE FRAGMENTADORES E DECOMPOSITORES

AUTORA: Cristiane Biasi

ORIENTADOR: Prof. Sandro Santos

CO-ORIENTADOR: Prof. Luiz Ubiratan Hepp

De acordo com a teoria do Contínuo Fluvial, nos pequenos rios florestados, que correspondem a ~80% das bacias hidrográficas, a principal fonte de energia para a cadeia trófica é o material produzido nas zonas ripárias, especialmente folhas. Este material passa pelo processo de decomposição, que é responsável pela ciclagem de nutrientes e manutenção das comunidades aquáticas. Neste contexto, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos dos traços físicos, químicos e fisiológicos das espécies vegetais na atividade de microrganismos e invertebrados decompositores, e como consequência nas taxas de decomposição. No primeiro capítulo investigamos a atividade de fragmentação de *Phylloicus* frente a recursos alimentares com características foliares diferentes. Nós constatamos que os fragmentadores têm sua atividade alimentar estimulada por substrato com menor quantidade de lignina, o que facilita o condicionamento por fungos e promove a palatabilidade do detrito. No segundo capítulo, investigamos a preferência alimentar e assimilação C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> por *Phylloicus* e *Aegla longirostri*. Constatamos que os fragmentadores consomem mais a espécie C<sub>4</sub>, porém não alteram sua assinatura isotópica. E a intensa atividade dos hifomicetos nas folhas C<sub>4</sub> estimulou o maior consumo pelos fragmentadores. No terceiro capítulo investigamos o efeito do enriquecimento de nutrientes no solo e na água na qualidade nutricional das folhas e nas taxas de decomposição. Evidenciamos que as plantas fertilizadas geraram folhas mais nutritivas que as não fertilizadas. Além disso, averiguamos que o efeito do aumento de nutrientes na água foi mais forte do que o efeito de nutrientes das folhas no processo de decomposição. Com os três capítulos verificamos que as atividades dos fragmentadores e fungos são influenciadas pelas características das folhas e estão relacionadas com a vegetação ripária, especialmente por carbono C<sub>3</sub>. Constatamos que os compostos estruturais são determinantes para a colonização microbiana e por consequência para a fragmentação e decomposição foliar. Verificamos também que o enriquecimento de nutrientes na água pode ser mais importante para o processo de decomposição foliar do que os nutrientes nas folhas.

**Palavras-chave:** *Aegla longirostri*. Hifomicetos. Enriquecimento de nutrientes. *Phylloicus*. Vegetação ripária.



## ABSTRACT

### REGULATOR FACTORS OF LEAF BREAKDOWN: AN APPROACH ON SHREDDERS AND DECOMPOSERS

AUTHOR: CRISTIANE BIASI  
ADVISOR: PROF. SANDRO SANTOS  
CO-ADVISER: PROF. LUIZ UBIRATAN HEPP

According to the *River Continuum Concept*, in small rivers, corresponding to ~ 80% of river basins, the main energy source for the trophic chain is the material produced in riparian zones, especially leaves. This material goes through the process of decomposition, which is responsible for the nutrients cycling and maintenance of aquatic communities. In this context, the objective of this study is to investigate the effects of physical, chemical and physiological traits of plant species on microbial activity and fragmentation, and as a consequence on decomposition rates. In the first chapter we investigated the activity of *Phylloicus* fragmentation in relation to food resources with different leaf traits. We found that the shredders have their food activity stimulated by substrate with less amount of lignin, which facilitates fungus conditioning and promotes the palatability of the detritus. In the second chapter, we investigated the feeding preference and assimilation of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> carbon by *Phylloicus* and *Aegla longirostri*. We found that the shredders consume more the C<sub>4</sub> species, but do not alter its isotopic signature and the intense activity of the hyphomycetes in the leaves C<sub>4</sub> stimulated the consumption by the shredders. In the third chapter we investigated the effect of nutrient enrichment on soil and water on leaf nutritional quality and decomposition rates. We showed that the fertilized trees promoted leaves more nutritious than leaves of unfertilized trees. In addition, we found that the effect of nutrient enrichment on water was stronger than the nutrient enrichment of leaves in the decomposition process. Within the three chapters, we verified that the activities of the shredders and fungi are influenced by the characteristics of the leaves and are related to the riparian vegetation, especially by C<sub>3</sub> carbon. We verified that the structural compounds are determinant for the microbial colonization and consequently for the fragmentation and litter decomposition. We also verified that the enrichment of nutrients in the water may be more important for the process of leaf decomposition than the nutrients in the leaves.

**Key-words:** *Aegla longirostri*. Enrichment of nutrients. Hyphomycetes. *Phylloicus*. Riparian zones.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1 – Effects of leaf traits on a typical shredder in Atlantic Forest streams: evidence from field and laboratory experiments

- Figure 1:** Hardness values (mean  $\pm$  SE) for *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* in (A) during the period of experiment in the field and (B) during the period of experiment in the laboratory. C: Cravo stream; H: Horto stream; D: Dourado stream ..... 54
- Figure 2:** Cross sections of leaves of (A) *Chusquea tenella* Ness and (B) *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. EAd: adaxial epidermis; EAb: abaxial epidermis; C: cuticle; SF: sclerenchyma fibers; PP: palisade parenchyma ..... 55
- Figure 3:** Abundance (mean  $\pm$  SE) of *Phylloicus* associated with decaying leaves of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* for 15 and 30 days of incubation in Dourado (D), Horto (H), and Cravo (C) stream ..... 56
- Figure 4:** (A) Consumption (mean  $\pm$  SE) of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* by *Phylloicus* ( $n = 15$ ); (B) Consumption (mean  $\pm$  SE) of *C. tenella* and *N. megapotamica* by *Phylloicus* ( $n = 54$ ) at different incubation times in the stream. C: *C. tenella*; N: *N. megapotamica*; 0: unconditioned detritus; 7: detritus with 7 days conditioning; 14: detritus with 14 days conditioning; DM: dry mass ..... 57

### CAPÍTULO 2 – Atividade microbiana e de fragmentação em plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> em riacho subtropical

- Figura 1:** Valores de (a) consumo diário e (b) preferência alimentar (mg dia<sup>-1</sup>) de *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) por *Phylloicus* e (c) consumo e (d) preferência alimentar de *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) por *Aegla longirostri* ..... 84
- Figura 2:** Abundância relativa das espécies de hifomicetos aquáticos associados a folhas de *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) durante 7 e 14 dias de experimento..... 87
- Figura 3:** Assinatura isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e nitrogênio e ( $\delta^{15}\text{N}$ ) estáveis das espécies vegetais *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) e dos fragmentadores testados no experimento de preferência alimentar e os fragmentadores amostrados no ambiente natural ..... 88

### CAPÍTULO 3 – Nutrient enrichment in water more than in leaves affect aquatic microbial litter decomposition

- Figure 1:** Dry mass (DM) loss (a), change in nitrogen (N) concentration (b) and change in carbon:nitrogen ratio (C:N) from initial values (c) of leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration for 15, 35 and 60 days. Values are means  $\pm$  SE ..... 122

**Figure 2:** Leaf toughness loss (a), microbial respiration rate (b), fungal biomass (c) and sporulation rate by aquatic hyphomycetes (d) associated with leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration for 15, 35 and 60 days. Values are means  $\pm$  SE ..... 125

**Figure 3:** Ordination (NMDS) of aquatic hyphomycete communities (based on conidial production) associated with leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration for 15, 35 and 60 days.... 129



## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - Effects of leaf traits on a typical shredder in Atlantic Forest streams: evidence from field and laboratory experiments**

- Table 1:** Environmental variables (mean  $\pm$  SE;  $n=3$ ) measured in Dourado, Horto and Cravo stream, during the experiment period. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) ..... 49
- Table 2:** Leaf characteristics (mean  $\pm$  SE) of the leaves of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* before incubation in the streams. C:N: Carbon:Nitrogen ratio. n.d: not determined; DM: dry mass..... 53
- Table 3:** Two-way ANOVA results for the abundance of *Phylloicus* associated with leaves of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica*. df: degrees of freedom; SS: sum of squares. In bold type: significant differences..... 56

### **CAPÍTULO 2 - Atividade microbiana e de fragmentação em plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> em riacho subtropical**

- Tabela 1:** Características foliares (média  $\pm$  EP) de *Nectandra megapotamica* (via C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) antes da incubação nos riachos. C:N=razão Carbono: Nitrogênio. MS= massa seca; DO= densidade ótica ..... 83
- Tabela 2:** Valores do Teste *t* e Anova two-way para a comparação entre o consumo e preferência alimentar de *Nectandra megapotamica* (via C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (via C<sub>4</sub>) por *Phylloicus* e *Aegla longirostri*. GL=graus de liberdade..... 85
- Tabela 3:** Valores (média $\pm$ EP) de taxa de esporulação e riqueza de espécies dos hifomicetos aquáticos associados a *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) durante 7 e 14 dias de colonização. MS=massa seca ..... 86
- Tabela 4:** Valores da Anova two-way para a Taxa de esporulação e Riqueza de espécies dos Hifomicetos aquáticos associados à *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>). GL=graus de liberdade ..... 86

### **CAPÍTULO 3 – Nutrient enrichment in water more than in leaves affect aquatic microbial litter decomposition**

- Table 1:** Physical and chemical characteristics (mean  $\pm$  SE,  $n = 5$ ) of senescent leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) oak trees (*t*-tests with *p* values)..... 121
- Table 2:** Nitrogen and carbon concentration and carbon:nitrogen ratio (C:N) (mean  $\pm$  SE,  $n = 5$ ) of oak leaves in different stages originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees ..... 121

- Table 3:** Exponential decomposition rates (*k*) of leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration, standard error (SE) and coefficient of determination of the regression ( $R^2$ ;  $p < 0.001$  in all cases). Treatments with the same letter are not significantly different (ANCOVA followed by Fisher's test,  $p > 0.050$ ) ..... 124
- Table 4:** Relative abundance (%) of aquatic hyphomycete species (based on conidial production) associated with leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration for 15, 35 and 60 days ... 128

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1 DECOMPOSIÇÃO FOLIAR .....	21
1.2 FRAGMENTADORES E SEU PAPEL NA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR .....	24
1.3 HIFOMICETOS AQUÁTICOS E SEU PAPEL NA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR .....	26
<b>2 ESTRUTURAÇÃO DA TESE</b> .....	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 HIPÓTESES</b> .....	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 1 EFFECTS OF LEAF TRAITS ON A TYPICAL SHREDDER IN ATLANTIC FOREST STREAMS: EVIDENCE FROM FIELD AND LABORATORY EXPERIMENTS</b> .....	<b>41</b>
Introduction .....	44
Materials .....	46
Results .....	52
Discussion.....	58
References .....	63
<b>CAPÍTULO 2 ATIVIDADE MICROBIANA E DE FRAGMENTAÇÃO EM PLANTAS C<sub>3</sub> E C<sub>4</sub> EM UM RIACHO SUBTROPICAL</b> .....	<b>71</b>
Introdução.....	74
Material e métodos .....	77
Resultados.....	83
Discussão .....	88
Referências Bibliográficas.....	95
<b>CAPÍTULO 3 NUTRIENT ENRICHMENT IN WATER MORE THAN IN LEAVES AFFECT AQUATIC MICROBIAL LITTER DECOMPOSITION</b> .....	<b>109</b>
Introduction .....	112
Materials and methods.....	114
Results .....	121
Discussion.....	130
References .....	136
Electronic supplemental material .....	144
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>149</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DECOMPOSIÇÃO FOLIAR

Os ecossistemas lóticos são sistemas que prestam importantes serviços à sociedade, nomeadamente como fornecedores de água para consumo, irrigação, indústria, assim como fonte de alimento e mantenedores de alta biodiversidade (TUNDISI, 2008). Cerca de 80% do comprimento total dos rios e riachos de uma bacia hidrográfica corresponde a pequenos ambientes, ou seja, com cursos geralmente com menos de 4 m de largura (ALLAN & CASTILLO, 2007). De acordo com o *River Continuum Concept* (VANNOTE et al., 1980), nestes pequenos riachos a principal fonte de energia para as comunidades aquáticas é o material produzido nas zonas ripárias, consistindo principalmente, de folhas das árvores e outros restos vegetais, como galhos, sementes e frutos (GONÇALVES & CALLISTO, 2013; LISBOA et al., 2015). Este material alóctone entra nos riachos por meio de movimentos verticais (quando os detritos caem diretamente da copa das árvores) e laterais (quando os detritos caem da margem dos riachos) (REZENDE et al., 2016). Este material, quando incorporado ao ecossistema aquático promove o fornecimento de recursos alimentares, disponibilidade de abrigo e habitat, e formação de substrato vegetal, relevantes para a manutenção das comunidades aquáticas (TIEGS et al., 2008).

Uma vez que os detritos vegetais entram em um riacho inicia-se a decomposição deste material. O processo de decomposição é contínuo, no qual a matéria orgânica passa por transformações mediadas por microorganismos decompositores e invertebrados consumidores (GESSNER et al., 1999; GRAÇA et al., 2015). Estes processos reduzem as partículas de matéria orgânica particulada grossa (MOPG) em matéria orgânica particulada fina (MOPF) e dissolvida (MOD), liberando nutrientes que tornam-se disponíveis para a cadeia trófica do ecossistema (TANAKA et al., 2006). Estas frações da matéria orgânica podem ser mantidas ou estocadas no leito, respiradas ou facilmente transportadas para trechos mais a jusante do corpo hídrico (WEBSTER & BENFIELD, 1986; TANK et al., 2010).

A decomposição foliar inicia-se com a abrasão física e lixiviação de compostos hidrossolúveis do detrito. Nessa etapa perde-se grande quantidade de massa nas primeiras 24 horas de imersão na água, ao passo que promove-se mudanças na composição química das folhas. Em seguida, ocorre o condicionamento microbiano do detrito, que promove o enriquecimento nutricional das folhas. Por fim, a decomposição é intensificada pela

fragmentação de invertebrados, que são responsáveis pela degradação final do detrito vegetal, reduzindo a matéria orgânica particulada grossa em partículas menores (RATNARAJAH e BARMUTA, 2009). Estas etapas da decomposição são interdependentes, não sendo possível uma distinção temporal entre elas (GESSNER et al., 1999).

O processo de decomposição foliar é determinado por alguns fatores extrínsecos, como as características dos riachos, dentre elas, a temperatura, vazão e composição química da água e a presença de organismos decompositores (CHARA et al., 2007; GRAÇA et al., 2015; FERREIRA et al., 2016). Além disso, fatores intrínsecos do detrito são determinantes para as taxas de decomposição, pois variam significativamente entre as espécies, o que podem gerar preferência dos organismos associados (GRAÇA, 2001). Dentre estes fatores intrínsecos, inclui-se a quantidade de nutrientes nas folhas, a concentração de compostos defensivos (taninos e polifenóis) e compostos estruturais (lignina e celulose) (ARDÓN et al., 2006; BASTIAN et al., 2007; RATNARAJAH e BARMUTA, 2009; GRAÇA & POQUET, 2014; GRAÇA et al., 2015).

Compostos químicos como lignina, celulose e polifenóis estão presumivelmente relacionados a defesa das plantas. Lignina constitui uma estrutura molecular complexa e de baixo conteúdo nutricional para os invertebrados (GESSNER, 2005). A celulose e lignina são, em termos de biomassa, os constituintes estruturais mais importantes das plantas (PÉREZ et al., 2002) e também das folhas senescentes, mesmo após a lixiviação. Consequentemente, detritos com grandes quantidades desses compostos tendem a ser altamente refratários, e em elevadas concentrações, principalmente de lignina, retardam a decomposição (GESSNER, 2005). Os compostos secundários, como polifenóis, possuem distintas funções ecológicas na planta, como alelopatia, ação atrativa ou repelente a organismos e que podem exercer efeito no processo de decomposição das plantas (HEPP et al., 2009).

Geralmente, detritos com altas concentrações de nitrogênio e baixa relação C:N apresentam uma decomposição mais rápida, além de serem mais consumidos pelos organismos associados (LIGEIRO et al., 2010; TONIN et al., 2014). Durante o processo de decomposição do detrito, o nitrogênio contido nas folhas tende a aumentar, devido à colonização microbiana, o que pode melhorar a qualidade nutricional da folha para os invertebrados (WEBSTER & BENFIELD, 1986). Assim, espécies de plantas com baixos teores de macromoléculas estruturais (celulose e lignina), compostos de defesa (polifenóis e taninos) e elevada concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo) são mais suscetíveis à colonização microbiana e a fragmentação por invertebrados, o que consequentemente favorece o aumento das taxas de decomposição (MATHURIAU & CHAUVET, 2002). Folhas

de baixa qualidade (alta concentração de compostos secundários e inibidores de herbivoria) podem explicar a baixa participação de organismos detritívoros na decomposição de material foliar em algumas regiões tropicais (GRAÇA & CRESSA, 2010). Juntos, esses fatores influenciam a estrutura da comunidade de invertebrados aquáticos, sua abundância relativa e suas interações tróficas.

Estes atributos foliares são selecionados em resposta a diferentes condições ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes no solo e variações no clima (REICH & OLEKSYN, 2004). Espera-se que plantas de regiões mais secas e pobres em nutrientes gerem folhas mais espessas e duras, diferentemente de plantas de solo rico em nutrientes, que devem gerar folhas com maior quantidade de nitrogênio e fósforo (WRIGHT et al., 2001; GRAÇA & POQUET, 2014). Assim, as mesmas espécies vegetais, influenciadas por diferentes condições ambientais devem diferir em suas características físicas e químicas e, conseqüentemente, em sua qualidade nutricional.

Neste contexto, o clima e a natureza geológica das variadas regiões do planeta influenciariam a qualidade das plantas como fonte de alimento para os consumidores, o que poderia explicar as diferenças observadas entre sistemas temperados e tropicais, bem como dentro dos trópicos (GRAÇA et al., 2015). Mas esta proposta permanece pouco explorada. Comparar a qualidade nutricional de plantas de várias regiões, assim como as suas taxas de decomposição pode ser uma forma de investigar o papel do clima e geologia na qualidade dos substratos para os decompositores, e isto foi realizado por GRAÇA & POQUET (2014). De fato, plantas da mesma espécie em condições climáticas diferentes e em solos que diferem na qualidade dos nutrientes produzem folhas senescentes que diferem física e quimicamente.

É consenso que a vegetação ribeirinha é um componente importante na dinâmica e estruturação das áreas de contato entre os ambientes terrestres e aquáticos, além de ser crucial na regulação dos ciclos biológicos e biogeoquímicos nas bacias hidrográficas (TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 2010). Recentes estudos têm mostrado que as comunidades aquáticas são relacionadas com a composição e quantidade dos bancos de folhas em riachos, que por sua vez estão relacionadas à composição e estrutura da vegetação ripária (LIMA & GONÇALVES, 2015; FERREIRA et al., 2016).

Tendo em vista que as práticas agrícolas têm levado à perda e substituição da vegetação natural, incluindo-se as zonas ripárias, as monoculturas de interesse econômico têm se expandido e alterando a quantidade e qualidade da matéria alóctone, e conseqüentemente as comunidades e o funcionamento dos processos ecológicos em riachos (CORBI & TRIVINHO-STRIXINO, 2006; CORBI & TRIVINHO-STRIXINO, 2008; BELTRÃO et al.,

2009; CASATTI et al., 2009; PRAMUAL & KUVANGKADILOK, 2009, ZHANG et al., 2010). As principais monoculturas, gramíneas e macrófitas aquáticas que têm avançado nas zonas ripárias consistem de espécies com via metabólica C<sub>4</sub> (CLAPCOOT & BUNN, 2003; LEITE-ROSSI & TRIVINHO-STRIXINO, 2012).

Apesar desse fato, os estudos sobre a decomposição de espécies vegetais envolvem em sua grande maioria, plantas com via metabólica C<sub>3</sub>, pois são dominantes em matas de vegetação ribeirinha na Mata Atlântica. Entretanto, em alguns locais, como o bioma Pampa, localizado na região sul do Rio Grande do Sul, as gramíneas com via metabólica C<sub>4</sub> são predominantes, e em alguns casos podem compor as zonas ripárias e assim, participar da dinâmica da matéria orgânica e contribuir para a cadeia alimentar do ambiente aquático (PILLAR et al., 2009). Apesar de as plantas C<sub>3</sub> serem responsáveis pela maior produtividade fotossintética mundial (ODUM, 1985), as plantas C<sub>4</sub> apresentam melhor desempenho em altas temperaturas e altas irradiâncias, devido à menor perda de carbono pela fotorrespiração (HELDT & PIECHULLA, 2005). A taxa de fotossíntese líquida e crescimento em plantas C<sub>4</sub> são usualmente maiores do que em plantas C<sub>3</sub> (RITCHER, 1993). Por apresentarem rápido crescimento, as espécies C<sub>4</sub> apresentam altas concentrações de carbono em sua matriz foliar, constituindo um recurso altamente energético e produtivo. Porém, alguns estudos têm relatado menor concentração de nitrogênio, fósforo e alguns minerais quando comparadas a espécies C<sub>3</sub>, mesmo apresentando maiores teores de fibras e maior energia (KJ g<sup>-1</sup>) (FORSBERG et al., 1993).

## 1.2 FRAGMENTADORES E SEU PAPEL NA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR

Os invertebrados desempenham importantes funções ecológicas em ecossistemas aquáticos, que estão relacionadas aos diversos hábitos alimentares desses organismos e com a sua própria ecologia trófica (PALMER et al., 1997). Os fragmentadores têm importante papel no processo de quebra da estrutura física da matéria orgânica particulada grossa, que abrange partículas >1,0 mm e as fraciona em partículas menores (> 0,25 e <1,0 mm) que servem de alimento para outros grupos funcionais, como coletores e filtradores (CUMMINS et al., 2005).

Os fragmentadores possuem aparelho bucal adaptado para consumir efetivamente o detrito e, assim, desempenham um papel chave na energética dos ecossistemas aquáticos de baixa ordem (ALLAN & CALLISTO, 2007). A atividade destes animais é importante por



promoverem a fragmentação das folhas, que providencia uma ligação entre a cabeceira e regiões a jusante do riacho, devido à transformação da MOPG em MOPF (GRAÇA et al., 2001) e por consumir as mesmas (WEBSTER e BENFIELD, 1986).

Na região Subtropical, os fragmentadores mais comumente encontrados são os insetos *Phylloicus* (Müller, 1880) (Trichoptera, Calamoceratidae) e os crustáceos *Aegla* (Decapoda, Anomura) (COGO & SANTOS, 2013; BIASI et al., 2016; TONELLO et al., 2016).

O gênero *Phylloicus* tem 52 espécies descritas, é o maior da família Calamoceratidae e suas espécies distribuem-se por toda América Latina, embora seja especialmente diverso no Brasil, Peru e Venezuela. São importantes dentre os invertebrados fragmentadores devido a seu tamanho corporal quando comparados a outras espécies, o que resulta em alta taxa de consumo foliar (GRAÇA, 2001; TONIN et al., 2014; REZENDE et al., 2014). Este gênero é encontrado em folhas submersas nas regiões de cabeceira dos riachos e são fragmentadoras (WANTZEN & WAGNER, 2006). No último instar larval constroem abrigos utilizando discos de folhas de várias espécies vegetais (WIGGINS, 1996; MORETTI et al., 2009).

A espécie *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 pertence a um grupo endêmico da região Sul da América do Sul (BOND-BUCKUP et al., 2008; SANTOS et al., 2008) e é reconhecido como importante estruturador das comunidades aquáticas (COGO et al., 2014; CEREZER et al., 2016), além de participar da decomposição foliar nesses riachos (COGO & SANTOS, 2013). É considerado um macroconsumidor, conceito relacionado exclusivamente a seu tamanho (LANDEIRO, 2008). Estes crustáceos são onívoros, alimentam-se de detrito vegetal e também de larvas de insetos, o que não os torna exclusivamente fragmentadores. Entretanto, neste estudo *A. longirostri* será considerada fragmentador.

Experimentos de laboratório têm mostrado que as taxas de alimentação dos fragmentadores são influenciadas pelo tipo de espécie vegetal (CANHOTO & GRAÇA, 1995), temperatura da água (NOLEN & PEARSON, 1993), qualidade química e física das folhas (GRAÇA & POQUET, 2014; CASOTTI et al., 2015; BIASI et al. Capítulo 1, submetido), a presença de predadores (REZENDE et al., 2015) e condicionamento microbiano. Levando em consideração que a atividade dos fragmentadores é um dos processos mais significativos para a decomposição da matéria orgânica, torna-se importante conciliar estudos sobre a decomposição de espécies vegetais que caem nos riachos com estudos experimentais envolvendo consumo e preferência alimentar. Ensaio laboratoriais envolvendo atividade alimentar de fragmentadores podem fornecer importantes indícios sobre os efeitos de alterações na vegetação ripária de riachos nas comunidades aquáticas.

### 1.3 HIFOMICETOS AQUÁTICOS E SEU PAPEL NA DECOMPOSIÇÃO FOLIAR

Os hifomicetos aquáticos são fungos que usam tecidos de plantas mortas como fonte de energia (SUBERKROPP, 1998) e assim participam da decomposição foliar (GRAÇA et al., 2015b). Este grupo tem ampla distribuição, com mais de 300 espécies estimadas, sendo a maioria registrada em regiões temperadas (GRAÇA et al., 2015b). Estes fungos têm reprodução assexuada por esporos e são adaptados a águas correntes (GULIS, 2001). A colonização destes fungos começa com a fixação de conídios na superfície do substrato, que pode ser afetada pelas características físicas das folhas, como dureza, tamanho e forma, como também a composição química do substrato, que pode estimular ou inibir a germinação (SUBERKROPP, 1998). Fatores externos, como a temperatura da água e a disponibilidade de nutrientes dissolvidos também afetam a colonização das folhas por hifomicetos (FERREIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2015).

A atividade microbiana promove a perda de massa foliar de diversas maneiras, como: (i) pela mineralização do carbono orgânico através da respiração (HIEBER & GESSNER, 2002; GULIS & SUBERKROPP, 2003; FERREIRA & CHAUVET 2011), (ii) pela atividade das enzimas extracelulares que promovem a quebra de compostos estruturais das folhas e facilitam a liberação de partículas finas de matéria orgânica (ARSUFFI & SUBERKROPP, 1985), (iii) pela incorporação do carbono das folhas em biomassa microbiana e estruturas reprodutivas (iv) pela imobilização do nitrogênio dissolvido da biomassa microbiana, tornando o material mais palatável para os invertebrados consumidores (GULIS & SUBERKROPP 2003; GULIS et al., 2006).

De acordo com alguns estudos, nos sistemas tropicais os hifomicetos aquáticos são menos abundantes do que nos sistemas temperados (BOYERO et al., 2012; JABIOL et al., 2013), embora exista informação oposta (BÄRLOCHER et al., 2010). Tem sido proposto que os hifomicetos apresentam picos de riqueza de espécies em latitudes médias e baixa riqueza de espécies em riachos tropicais (JABIOL et al., 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade deste grupo nas regiões tropicais e subtropicais e, aliado a isto, deve-se atentar ao fato da grande diferença que sistemas tropicais e subtropicais tem entre si (GRAÇA et al., 2015b). Algumas razões para a baixa diversidade de hifomicetos nas zonas tropicais foram propostas por GRAÇA et al. (2015b), como segue: (i) o efeito da falta de sazonalidade, em termos de temperatura e entrada de material alóctone nos riachos, que pode promover baixa heterogeneidade dos locais; (ii) diferenças na história de vida deste grupo de fungos, que pode resultar em baixo investimento de reprodução, e neste caso as técnicas mais utilizadas podem

não identificá-los; (iii) condições físicas dos riachos limitantes, como baixa turbulência; (iv) baixa quantidade de nutrientes dissolvidos na água; (v) baixa qualidade do substrato e (vi) competição com outros decompositores.

A atividade alimentar dos fragmentadores pode ser fortemente influenciada pela presença de hifomicetos aquáticos nas folhas em decomposição (FOUCREAU et al., 2013). Esta relação sinérgica, entre os hifomicetos e os invertebrados consumidores na perda de massa, pode ser explicada pelos benefícios da colonização dos fungos nas folhas, dentre eles: (i) melhoram a qualidade do detrito pela acumulação de biomassa fúngica, (ii) digerem compostos estruturais nos tecidos foliares e (iii) os fungos servindo de alimento para os fragmentadores (ARSUFFI & SUBERKROPP, 1988; GRAÇA et al., 2001; GULIS, 2001). Estes benefícios na atividade alimentar podem resultar em aumento do fitness e taxa de reprodução dos invertebrados consumidores (GONZÁLEZ & GRAÇA, 2003).



## 2 ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Com base no que foi exposto, esta Tese busca, nos três capítulos seguintes, esclarecer as relações entre os fragmentadores e fungos decompositores com as espécies vegetais que compõem as zonas ripárias de riachos florestados. As investigações dos capítulos 1 e 2 foram realizadas em sistemas aquáticos subtropicais, que são pouco conhecidos em relação a seu processamento de matéria orgânica, especialmente sobre o papel dos fragmentadores e fungos decompositores. Estes organismos têm papel reconhecido na decomposição foliar de sistemas temperados, entretanto em sistemas subtropicais são pouco compreendidos, especialmente os hifomicetos, para os quais inexistente registro de lista de espécies para a região.

A investigação realizada no capítulo 3 foi desenvolvida em sistema aquático temperado e trouxe importantes resultados sobre a decomposição foliar em ambientes enriquecidos por nutrientes, que podem ser extrapolados para outras regiões, como a região subtropical. Dessa forma, os resultados aqui apresentados representam uma contribuição ao maior entendimento da participação dos fragmentadores *Phylloicus* e *Aegla longirostri* no processamento de matéria orgânica, visto que são os fragmentadores mais representativos em termos de biomassa, da região subtropical. Aliado a isto, esta Tese registra a primeira lista de espécies de fungos Hifomicetos para a região subtropical e acrescenta informações sobre seu papel no condicionamento e decomposição de detritos vegetais.

Os capítulos a seguir constituem-se em manuscritos científicos que atendem às especificações das revistas, para as quais foram encaminhados, com exceção do capítulo 2. As figuras e tabelas foram inseridas no corpo do texto para facilitar a leitura.

No Capítulo 1 (*Effects of leaf traits on a typical shredder in Atlantic Forest streams: evidence from field and laboratory experiments*) foi investigado os efeitos dos atributos físicos e químicos das espécies vegetais na abundância e atividade alimentar do fragmentador *Phylloicus* da região subtropical. Foram utilizadas folhas de *Nectandra megapotamica* e *Chusquea tenella* em experimento de campo e laboratório para permitir a colonização por fungos e a fragmentação por *Phylloicus*.

No Capítulo 2 (*Atividade microbiana e de fragmentação em plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> em riacho subtropical*) foi investigado o efeito da via metabólica das plantas sobre a atividade de fragmentação de *Phylloicus* e *Aegla longirostri* e sobre decomposição por fungos hifomicetos. A comunidade de fungos hifomicetos foi estudada, gerando a primeira lista de espécies para a região subtropical. Além disso, foi investigada a contribuição do carbono C<sub>4</sub> para os

fragmentadores da região subtropical. O manuscrito será submetido para a Revista “Aquatic Science”.

No Capítulo 3 (*Nutrient enrichment in water more than in leaves affect aquatic microbial litter decomposition*) foi investigado o efeito do enriquecimento de nutrientes no solo e na água sobre os atributos físicos e químicos das espécies vegetais, e no processo de decomposição foliar, mediado pelos Hifomicetos, em ecossistema temperado. Este manuscrito foi submetido para a Revista “Oecologia” e encontra-se aceito para publicação (doi: 10.1007/s00442-017-3869-5).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos dos atributos intrínsecos das espécies vegetais na atividade alimentar de fragmentadores, na colonização de fungos hifomicetos e na decomposição foliar em riachos florestados.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito das características físicas e químicas das espécies vegetais no consumo e preferência alimentar de *Phylloicus* com abordagem de campo e laboratório.
2. Investigar a preferência e assimilação de espécies C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> por *Phylloicus* e *Aegla longirostri* por meio de isótopos estáveis.
3. Conhecer a comunidade de fungos hifomicetos da região subtropical e investigar sua colonização em espécies C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>.
4. Investigar o efeito do enriquecimento de nutrientes no solo e na água nas características foliares e as consequências na colonização microbiana e nas taxas de decomposição foliar.





#### 4 HIPÓTESES

Diante dos objetivos supracitados, esta tese testou as seguintes hipóteses: (i) os fragmentadores da região subtropical têm sua atividade alimentar influenciada pelas características físicas e químicas das folhas e irão consumir preferencialmente detritos mais macios (menor dureza e lignina), nutritivos (maior concentração de nitrogênio e menor de C:N) e condicionados pelos fungos; (ii) Os fragmentadores irão consumir e assimilar mais o carbono C<sub>3</sub> devido a sua familiaridade com este recurso alimentar, dominante em matas ciliares; (iii) a atividade dos fungos hifomicetos será determinada pelas características físicas das plantas, especialmente por atributos estruturais, como baixa quantidade de lignina; (iv) a comunidade de fungos hifomicetos irá colonizar as folhas de maneira diferenciada em resposta a diferenças físicas do substrato; (v) a via metabólica das plantas poderá influenciar a atividade de fragmentação por via indireta, ou seja, a colonização dos hifomicetos poderá ser sensível às diferenças físicas e químicas resultantes da via metabólica C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub> e, assim, promoverá diferenças na palatabilidade das folhas e no consumo pelos fragmentadores; (vi) o enriquecimento de nutrientes no solo irá gerar folhas com maior concentração de nutrientes e menor nível de compostos estruturais e secundários; (vii) folhas menos recalcitrantes (maior concentração de nutrientes e menor concentração de compostos estruturais) irão suportar maior atividade dos fungos hifomicetos e assim irão apresentar maiores taxas de decomposição; (viii) o enriquecimento de nutrientes na água irá estimular a atividade dos fungos hifomicetos e as taxas de decomposição; (ix) a comunidade de fungos hifomicetos irá reponder as mudanças na composição química das folhas e ao enriquecimento de nutrientes na água.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. **Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters**. 2nd Edition. Springer, Dordrecht, 2007.
- ARDÓN, M.; STALLCUP, L. A.; PRINGLE, C. M. Does leaf quality mediate the stimulation of leaf breakdown by phosphorus in Neotropical streams? **Freshwater Biology**, v. 51, p. 618-633, 2006.
- ARSUFFI, T. L.; SUBERKROPP, K. Selective feeding by stream caddisfly (Trichoptera) detritivores on leaves with fungal-colonized patches. **Oikos**, v. 45, n. 1, p. 50–58, 1985.
- BÄRLOCHER, F.; HELSON, J. E.; WILLIAMS, D. D. Aquatic hyphomycete communities across a land-use gradient of Panamanian streams. **Fundamental Applied of Limnology**, v. 177, n. 3, p. 209-221, 2010.
- BASTIAN, M.; BOYERO, L.; JACKES, B. R.; PEARSON, R. G. Leaf litter diversity and shredder preferences in an Australian tropical rain-forest stream. **Journal of Tropical Ecology**, v. 23, p. 219–229, 2007.
- BELTRÃO, G. B. M.; MEDEIROS, E. S. F.; RAMOS, R. T. C. Effects of riparian vegetation on the structure of the marginal aquatic habitat and the associated fish assemblage in a tropical Brazilian reservoir. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 4, p. 37-43, 2009.
- BIASI, C.; CEREZER, C.; SANTOS, S. Biological colonization and leaf decomposition in a subtropical stream. **Ecología Austral**, v. 26, p. 189-199, 2016.
- BOYERO, L.; BARMUTA, L. A.; RATNARAJAH, L.; SCHMIDT, K.; PEARSON, R. G. Effects of exotic riparian vegetation on leaf breakdown by shredders: a tropical–temperate comparison. **Freshwater Science**, v. 31, n 2, p. 296-303, 2012.
- BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; PEREZ-LOSADA, M.; BUCKUP, L.; CRANDALL, K. A. Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267–273, 2008.
- CANHOTO, C.; GRAÇA, M. A. S. Food value of introduced eucalypt leaves for a Mediterranean stream detritivore: *Tipula lateralis*. **Freshwater Biology**, v. 34, p. 209–214, 1995.
- CASATTI, L., FERREIRA, C. P.; CARVALHO, F. R. Grass-dominated stream sites exhibit low fish species diversity and dominance by guppies: an assessment of two tropical pasture river basins. **Hydrobiologia**, v. 632, p. 273-283, 2009.
- CASOTTI, C. G.; KIFFER, W. P. Jr.; MORETTI, M. S. Leaf traits induce the feeding preference of a shredder of the genus *Triplectides kolenati*, 1859 (Trichoptera) in an Atlantic Forest stream, Brazil: a test with native and exotic leaves. **Aquatic Insects**, v. 36, p. 43–52, 2015.

CEREZER, C.; BIASI, C.; COGO, G. B.; SANTOS, S. Avoid predation or take risks in basic activities? Predator-prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. **Marine and Freshwater Research**, v. 67, n. 12, p. 1880-1887, 2016.

CHARA, J.; BAIRD, D.; TELFER, T.; GIRALDO, L. A Comparative Study of Leaf Breakdown of Three Native Tree Species in a Slowly-Flowing Headwater Stream in the Colombian Andes. **International Review of Hydrobiology**, v. 92, p. 183–198, 2007.

CLAPCOTT, J.E.; BUNN, S.E. Can C<sub>4</sub> plants contribute to aquatic food webs of subtropical streams? **Freshwater Biology**, v. 48, p. 1105–1116, 2003.

COGO, G. B.; BIASI, C.; SANTOS, S. The effect of the macroconsumer *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda) on the invertebrate community in a subtropical stream. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n.2, p. 143–153, 2014.

COGO, G. B.; SANTOS, S. The role of aeglids in shredding organic matter in neotropical streams. **Journal of Crustacean Biology**, v. 34, n. 4, p. 519-526, 2013.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Influence of taxonomic resolution of stream macroinvertebrate communities on the evaluation of different land uses. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 4, p. 469-475, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 769-779, 2008.

CUMMINS, K. W.; MERRITT, R. W.; ANDRADE, P. C. N. The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil. **Studies Neotropical Fauna Environment**, v. 40, p.69-89, 2005.

FERREIRA, V.; CASTAGNEYROL, B.; KORICHEVA, J.; GULIS, V.; CHAUVET, E.; GRAÇA, M. A. S. A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams. **Biological Review**, v. 90, p. 669–688, 2015.

FERREIRA, V.; CASTELA, J.; ROSA, P.; TONIN, A. M.; BOYERO, L.; GRAÇA, M. A. S. Aquatic hyphomycetes, benthic macroinvertebrates and leaf litter decomposition in streams naturally differing in riparian vegetation. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 4, p. 711-725, 2016.

FERREIRA, V.; CHAUVET E. Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. **Global Change of Biology**, v. 17, n.1, p. 551–564, 2011.

FERREIRA, V.; GULIS, V.; GRAÇA, M. A. S. Whole stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. **Oecologia**, v. 149, n.4, p. 718–729, 2006.

FORSBERG, B. R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; BONASSI, J. A. Autotrophic carbon sources for fish of the central Amazon. **Ecology**, v. 74, n.3, p. 643–651, 1993.

FOUCREAU, N.; PUIJALON, S.; HERVANT, F.; PISCART, C. Effect of leaf litter characteristics on leaf conditioning and on consumption by *Gammarus pulex*. **Freshwater Biology**, v. 58, n.8, 1672–1681, 2013.

GESSNER, M. O. Ergosterol as a measure of fungal biomass. In: GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. (eds). **Methods to Study Litter Decomposition. A Practical Guide**, 329 p. 2005.

GESSNER, M. O.; CHAUVET, E.; DOBSON, M. A perspective on leaf litter breakdown in stream. **Oikos**, 85, n.82, p. 377-384, 1999.

GONÇALVES, JR. J. F.; CALLISTO, M. Organic-matter dynamics in the riparian zone of a tropical headwater stream in Southern Brasil. **Aquatic Botany**, v. 109, p. 8–13, 2013.

GRAÇA, M.A.S. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams e a review. **International Review of Hydrobiology**, v. 86, p. 383-393, 2001.

GRAÇA, M. A.; CRESSA, C. Leaf quality of some tropical and temperate tree species as food resource for stream shredders. **International Review of Hydrobiology**, v. 95, n. 27–41, 2010.

GRAÇA, M. A. S.; CRESSA C.; GESSNER, M. O.; FEIO, M. J.; CALLIES, K. A.; BARRIOS, C. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**, v. 46, p. 947–957, 2001.

GRAÇA, M. A. S.; FERREIRA, V.; CANHOTO, C.; ENCALADA, A. C.; GUERRERO-BOLANO, F.; WANTZEN, K. M.; BOYERO, L. A. conceptual model of litter breakdown in low order streams. **International Review of Hydrobiology**, v. 100, p. 1-12, 2015a.

GRAÇA, M. A. S.; HYDE, K.; CHAUVET, E. Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical e subtropical low order streams. **Fungal Ecology**, v. 100, p. 1-12, 2015b.

GRAÇA, M. A. S.; POQUET, J. M. Do climate and soil influence phenotypic variability in leaf litter, microbial decomposition and shredder consumption? **Oecologia** 174: 1021–32, 2014.

GONZÁLEZ, J. M.; GRAÇA, M. A. S. Conversion of leaf litter to secondary production by the shredder caddisfly *Sericostoma vittatum*. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 1578-1592, 2003.

GULIS, V. Are there any substrate preferences in aquatic hyphomycetes? **Mycological Research**, v. 105, n.9, p. 1088-1093, 2001.

GULIS, V.; FERREIRA, V.; GRAÇA, M. A. S. Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. **Freshwater Biology**, v. 51, p. 1655–1669, 2006.

GULIS, V.; SUBERKROPP, K. Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 123–134, 2003.

HELDT, H. W.; PIECHULLA, B. **Plant biochemistry**. 3rd. San Diego: Elsevier Academic Press, 656 p. 2005.

HEPP, L. U.; DELANORA, R.; TREVISAN, A. Compostos secundários durante a decomposição foliar de espécies arbóreas em um riacho do sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 407 – 413, 2009.

HIEBER, M.; GESSNER, M. O. Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. **Ecology**, v. 83, p. 1026–1038, 2002.

JABIOL, J.; BRUDER, A.; GESSNER, M. O.; MAKKONEN, M.; MCKIE, B. G.; PEETERS, E. T. H. M.; VOS, V. C. A.; CHAUVET, E. Diversity patterns of leaf-associated aquatic hyphomycetes along a broad latitudinal gradient. **Fungal Ecology**, v. 6, p. 439-448, 2013.

LANDEIRO, V. L.; HAMADA, N.; MELO, A. M. Responses of aquatic invertebrate assemblages and leaf breakdown to macroconsumer exclusion in Amazonian ‘terra firme’ streams. **Fundamental Applied of Limnology**, v. 172, p.49-58, 2008.

LEITE-ROSSI, L. A.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Are sugar cane leaf-detritus well colonized by aquatic macroinvertebrates? **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, p.303-313, 2012.

LIGEIRO, R.; MORETTI, M. S.; GONÇALVES JR. J. F.; CALLISTO, M. What is more important for invertebrate colonization in a stream with low-quality litter inputs: exposure time or leaf species? **Hydrobiologia**, v. 654, p. 125–136, 2010.

LIMA, L. S.; GONÇALVES JR, J. F. Heterogeneidade temporal e espacial na composição química do detrito foliar. In Livro de resumos do II Simpósio Processos Ecológicos, Restauração e Ecoavaliação em Zonas Ripárias (AquaRipária). Brasília: AquaRipária, 2015, p. 12-15.

LISBOA, L.; SILVA, A. L. L; SEIGLOSH, A. A.; GONÇALVES, J. F. Jr.; PETRUCIO, M. M. Temporal dynamics of allochthonous coarse particulate organic matter in a subtropical Atlantic Rainforest Brazilian stream. **Marine and Freshwater Research**, v. 66, p. 1-7, 2015.

MATHURIAU, C.; CHAUVET, E. Breakdown of leaf litter in a neotropical stream. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 21, p. 384 – 396, 2002.

MORETTI, M. S.; LOYOLA, R. D.; BECKER, B.; CALLISTO, M. Leaf abundance and phenolic concentrations codetermine the selection of case-building materials by *Phylloicus* sp. (Trichoptera, Calamoceratidae). **Hydrobiologia**, v. 630, p. 199–206, 2009.

NOLEN, J. A.; PEARSON, R. G. Factors affecting litter processing by *Anisocentropus kirranus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from an Australian tropical rainforest stream. **Freshwater Biology**, v. 29, p. 469–479, 1998.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 434 p. 2012.

PALMER, M. A.; COVICH, A. E.; FINLAY, B. J.; GILBERT, J.; HYDE, K. D.; JOHNSON, R. K.; KAIRESAIO, T.; LAKE, S.; LOVELL, C. R.; NAIMAN, R. J.; RICCI, C.; SABATER, F.; STRAYER, D. Biodiversity and ecosystem processes in freshwater sediments. **Ambio** v. 26, p. 571-577, 1997.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.

PILLAR, V. P.; MULLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. 2009. **Campos Sulinos. Conservação e uso sustentável da biodiversidade**, Ministério do Meio Ambiente, 403 p. 2009.

PRAMUAL, P.; KUVANGKADILOK, C. Agricultural land use and black fly (Diptera, Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. **Hydrobiologia**, v. 625, p. 173-184, 2009.

RATNARAJAH, L.; BARMUTA, L. A. The effects of leaf toughness on feeding preference by two Tasmanian shredders. **Hydrobiologia**, v. 636, p. 173–178, 2009.

REICH, P. B.; OLEKSYN, J. Global patterns of plant leaf N and P in relation to temperature and latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 11001–11006, 2004.

REZENDE, R. S.; GRAÇA, M. A. S.; SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. O.; SANTOS, P. F.; NUNES, Y. R. P.; GONÇALVES JR, J. F. Organic Matter Dynamics in a Tropical Gallery Forest in a Grassland Landscape. **Biotropica**, v.48, n. 3, p. 301-310, 2016.

REZENDE, R. S.; LEITE, G. F. M.; DE-LIMA, A. K.; SILVA-FILHO, L. A. B.; CHAVES, C. V. C.; PRETTE, A. C. H.; FREITAS, J. S.; GONÇALVES, J. F. JR. Effects of density and predation risk on leaf litter processing by *Phylloicus* sp. **Austral Ecology**, v. 40, n. 6, p. 693–700, 2015.

RICHTER, G. Métabolisme des végétaux. physiologie et biochimie. **Lausanne Presses polytechniques et universitaires romandes**, 1993.

SANTOS, S.; AYRES-PERES, L.; CARDOSO, R. C. F.; SOKOLOWICZ, C. C. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**, v. 42, p. 1027-1037, 2008.

SUBERKROPP, K. Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter. **Mycological Research**, v. 102, p. 998–1002, 1998

TANAKA, M. O.; RIBAS, A. C. A.; SOUZA, A. L. T. Macroinvertebrate succession during leaf litterbreakdown in a perennial karstic river in Western Brazil. **Hydrobiologia**, v. 568, p. 493–498, 2006.

TANK, J. L.; ROSI-MARSHALL, E. J.; GRIFFITHS, N.A.; ENTREKIN, A. S.; STEPHEN, M. L. A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 29, p.118–146, 2010.

TIEGS, S. D.; PETER, F. D.; ROBINSON, C. T.; UEHLINGER, U.; GESSNER, M. O. Leaf decomposition and invertebrate colonization responses to manipulated litter quantity in streams. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 27, p. 321–331, 2008.

TONELLO, G.; NAZILOSKI, L. A.; TONIN, A. M.; RESTELLO, R. M.; HEPP, L. U. Effect of *Phylloicus* on leaf breakdown in a subtropical stream. **Limnetica**, v. 35, p.243–252, 2016.

TONIN, A. M.; RESTELLO, R. M.; HEPP, L. U. Chemical change of leaves during breakdown affects associated invertebrates in a subtropical stream. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 235-244, 2014.

TUNDISI, J. G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 7-16, 2008.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, A. Impactos potenciais das alterações do Código Florestal nos recursos hídricos. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 67-76, 2010.

VANNOTE, R. L.; MINSHALL, G. W.; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J. R.; CUSHING, C. E. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, p. 130-137, 1980.

WANTZEN, K. M.; WAGNER, R. Detritus processing by invertebrate shredders: a neotropical temperate comparison. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 25, p. 216–232, 2006.

WEBSTER, J. R.; BENFIELD, E. F. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 17, p. 567–594, 1986.

WIGGINS, G. B. **Larvae of North American Caddisfly Genera (Trichoptera)**, 2nd edn. University of Toronto Press: Toronto, ON, Canada, 457 p. 1996.

WRIGHT, I. J.; REICH, P. B.; WESTOBY, M. Strategy-shifts in leaf physiology, structure and nutrient content between species of high and low rainfall, and high and low nutrient habitats. **Functional Ecology**, v. 15, p. 423–434, 2001.

ZHANG, Y.; DUDGEON, D.; CHENG, D.; THOE, W.; FOK, L.; WANG, Z.; LEE, J. H. W. Impacts of land use and water quality on macroinvertebrate communities in the Pearl River drainage basin, China. **Hydrobiologia**, v. 652, n. 1, p.71-88, 2010.



## CAPÍTULO 1

### EFFECTS OF LEAF TRAITS ON A TYPICAL SHREDDER IN ATLANTIC FOREST STREAMS: EVIDENCE FROM FIELD AND LABORATORY EXPERIMENTS



RIACHO LOCALIZADO NA FLORESTA ATLÂNTICA EM QUE FORAM INCUBADOS *LITTER BAGS* COM FOLHAS PARA O PROCESSO DE CONDICIONAMENTO E COLONIZAÇÃO DOS FRAGMENTADORES.

Artigo formatado segundo as normas da Revista “Limnologica” (ISSN: 0075-9511); Fator de Impacto 1,403; Qualis CAPES Estrato B1; Submetido.

**Effects of leaf traits on a typical shredder in Atlantic Forest streams: evidences from field and laboratory experiments**

**Cristiane Biasi<sup>1</sup>, Gláucia Bolzan Cogo<sup>1</sup>, Luiz Ubiratan Hepp<sup>2</sup>, Sandro Santos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Departamento de Ecologia & Evolução, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Avenida Sete de Setembro 1621, 99709-910, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: cristiane.biasi@gmail.com

Phone: +55 (55) 3220-8465 Extention 20

**Abstract**

We investigated, in field and laboratory experiments, whether the leaf traits of two tree species affect the abundance and feeding preference of a typical shredder. In the field experiment, we compared the association of *Phylloicus* (Calamoceratidae, Trichoptera) between two species (*Nectandra megapotamica* and *Chusquea tenella*). In the laboratory experiment, we investigated the feeding preference of *Phylloicus*, by using the same species used in the field experiment, with different microbial conditioning times. Initially, the leaves of *C. tenella* proved more nutritious and soft, while the leaves of *N. megapotamica* were harder and lignified. The shredders preferred detritus with reduced hardness and more conditioning time (field: *C. tenella*, 30 days; laboratory: *N. megapotamica*, 14 days), i.e., they seem to be determining factors for the choice of *Phylloicus*. The decrease in hardness with increasing conditioning time explained the consumption pattern observed in *N. megapotamica*, which had a drop in hardness in 14 days. We found evidence in the field and laboratory that the *Phylloicus* are selective in concerning food and that the leaf traits determine the association and preference of shredders.

**Keys-words:** abundance, C:N ratio, feeding preference, leaf hardness, *Phylloicus*

**Running head:** Effects of leaf traits on a typical shredder

## Introduction

The quality and amount of organic matter available in leaf litter banks directly influence the aquatic communities of small forested streams (Going and Dudley, 2008; Garcia et al., 2012; Gonçalves et al., 2014.). The entry of allochthonous material in these streams is primary source of nutrients, energy and shelter for invertebrates, in particular for shredders, which consume a significant part of the leaves that decompose in aquatic environments (Wallace et al., 1997; Pettit et al., 2012). These organisms are responsible for turning coarse particulate organic matter into fine particulate and dissolved organic matter, which becomes available for other aquatic invertebrates (Wallace and Webster, 1996).

The activity of shredders is a significant process for the decomposition of organic matter and can account for 50 to 74% of the decomposition rates in temperate regions, depending on the plant species (Cuffney et al., 1990). For both tropical and subtropical regions, studies point to a low participation of shredders in leaf decomposition (Boyero et al., 2015). A recent global survey found that tropical streams may have ~ 2.5 times fewer shredders density than in temperate regions (Boyero et al., 2011). However, this is not the rule, as there are reports of tropical streams with high densities of shredders (Cheshire et al., 2005; Yule et al., 2009). The leaf characteristics, microbial activity and environmental variables in streams are factors that should be further investigated to determine their effects on the shredders community in a tropical region (Rezende et al., 2015).

The genus *Phylloicus* (Müller, 1880) (Calamoceratidae, Trichoptera) is the main shredder of an aquatic community in the subtropical region (Prather, 2003). The larval stage of this group is found under leaves of banks in the headwaters of the streams (Wantzen and Wagner, 2006) and the leaf fragmentation activity of these organisms is intended to feeding and case-building (Vannote et al., 1980). The *Phylloicus* proved to be selective concerning detritus. For feeding themselves, they prefer having leaves with a higher nutritional quality

(Rincón and Martínez, 2006), while for the case-building, they prefer leaves with more polyphenols, harder and more lignified (Moretti et al., 2009; Cerezer et al., 2016).

The diversity of species that make up the riparian vegetation in tropical streams provides various types of detritus to leaf litter banks (Gonçalves et al., 2014). Thus, in the aquatic environment, shredders find a high diversity of leaf resources for their activities. As a result of this diversity, leaf resources differ in their characteristics (physical, chemical, and anatomical). These differences in characteristics of the leaves may influence the activity of shredders as to restrict their consumption, causing the organisms to prefer a particular type of detritus and reject another (Graça, 2001).

Intrinsic characteristics of leaves such as hardness, nutrients contents and the presence of secondary metabolites are all factors that may explain the selectivity of shredders across different leaf species (Graça, 2001; Ratnarajah and Barmuta, 2009; König et al., 2014). On the other hand, the influence of leaf anatomy in the selection of shredders has been little studied. Casotti et al. (2015) showed the influence of leaf anatomy on the consumption of caddisfly *Triplectides kolenati*, since the larvae avoided the sclerenchyma fibers and oil-secreting glands. The presence of oils in leaves of *Eucalyptus globulus* also restricted their consumption by shredder *Tipula lateralis* (Canhoto and Graça, 1999). Harder leaves (resistant to physical abrasion) and with higher concentrations of secondary compounds (polyphenols) may be difficult to be consumed and restrict the activity of shredders (Rincón and Martínez, 2006). Besides, more nutritious leaves (with high concentrations of nitrogen and low C:N ratio) (König et al., 2014) and conditioned by aquatic fungi, become more palatable and appealing to shredders (Mathuriau and Chauvet, 2002).

In this study, we conducted field and laboratory experiments, in order to investigate whether the leaf traits (physical, chemical, and anatomical characteristics) of two tree species affect the abundance and feeding preference of a typical shredder. In the field experiment, we

compared the *Phylloicus* association between two contrasting species in leaf traits (*Nectandra megapotamica* and *Chusquea tenella*). In the laboratory experiment, we investigated the consumption and feeding preference of shredders, by using the same plant species used in the field experiment. Our hypothesis is that the larvae prefer and consume a greater quantity of softer, nutritious and conditioned leaves. Thus, both in the field and in the laboratory, they will prefer items with reduced hardness, with higher concentrations of nitrogen, a lower C:N ratio and more conditioned by the microbial community.

## **Materials**

### **Leaf sampling**

We collected senescent leaves of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae) and *Chusquea tenella* Nees (Poaceae) in riparian zones of the study area during the 2013 autumn. Both species are native to South America and the choice was based on their wide occurrence and abundance in riparian zones of streams. All the collected leaves were air dried at room temperature (~20°C) until they were used in the experiments. Approximately 5 g of leaves of each species were sampled to characterize the leaf traits.

### **Leaf traits**

We analyzed the characteristics of the plant species prior to conducting the experiments. In order to analyze the concentrations of nitrogen, polyphenol, lignin, cellulose, carbon, and metals, we ground the leaves (1 mm) in a mill (Marconi/MA 048). We quantified the nitrogen concentration of leaves by following the Kjeldahl method (Flindt and Lillebo, 2005), which determines the concentration by dissolving the plant material with concentrated sulfuric acid, followed by distillation and titration to quantify the amount of ammonia received in the solution. For the polyphenol extraction, samples were dissolved in methanol at

50%, during 24 hours, and afterward, the filtered material was subjected to the Folin Denis reagent and sodium carbonate. The concentration of polyphenols is determined in OD (optical density) by reading the samples in a spectrophotometer (Perkielmeier/Lambda EZ 150) at 725 nm wavelength (Schwarze, 1958).

We incinerated approximately 3 g of leaves of each species for the determination of ash-free dry mass (AFDM) in a muffle furnace (Lavoisier/Model 400 C) (at 550°C, during 4 hours). The inorganic material resulting from incineration was diluted in HNO<sub>3</sub> (1 mol L<sup>-1</sup>) and analyzed through an atomic absorption spectrophotometer (Varian/Spectr AA55) for the determination of metals (calcium, magnesium, potassium and sodium). To determine the concentration of calcium and magnesium, about 5 mL of lanthanum oxide at 0.1% was added to the solution for dilution (Bataglia and Gallo, 1972). We estimated the carbon concentration in the leaves by the results of the ash-free organic matter (AFDM) analysis, and used the relationship proposed by Westlake (1963), assuming that 47% of the organic matter of the leaves consists of carbon. We calculated the percentage of lignin and cellulose by applying the detergent acid method (Van Soest, 1993). The determination of lignin is carried out by using sulfuric acid (72%) followed by incineration of the residue (at 500°C, during 2 hours). The concentration of cellulose was determined by the difference in weights from the residue resulting from the determination of lignin.

The hardness of leaves was measured with a penetrometer constructed with two acrylic plates with a metal pin (diameter 2.5 mm) vertically stuck to an acrylic holder. On this holder, the weight is adjusted with water in a glass beaker and the pressure exerted on the metal pin is used to pierce a leaf (Nolen and Pearson, 1993). The pressure P required for the metal pin to penetrate the leaf was calculated by  $P = F/A$ , where F is the volume of the water plus the weight of the holder with the metal pin and the weight of the beaker glass, divided by the area A in which the force is applied (area of the tip of the metal pin).

For the preparation of histological slides, the leaves (senescent) of the two species were fixed in an FAA solution (Formalin, Acetic-Alcohol 50%), and dehydrated in increasing concentrations of methanol (50% to 100%), then embedded in paraffin. Cross sections (microtome SLEE/CUT4062) of plant material were stained in an astra blue and safranin solution, and the slides were observed in an optical microscope with a magnification of 400×.

### **Field Approach – Abundance of shredder in streams**

#### Study area

The experiment was carried out in three streams of small order (<2nd order) located in southern Brazil (Table 1). The climate is subtropical, with an average annual temperature of 17.6°C and average annual rainfall of 1912 mm. The typical vegetation is an extension of the Atlantic Forest and shows a transition between Semidecidual Seasonal Forest and Araucaria Forest (Oliveira-Filho et al., 2006). The plant formation includes temperate species as *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Vernonia discolor* (Spreng.) Less and *Piptocarpha angustifolia* (Dusen ex Malme), and deciduous species as *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr, *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, *Sebastiania brasiliensis* (Spreng.) and *Campomanesia xanthocarpa* (O. Berg.).

The streams have an established riparian vegetation (approximately 70% of canopy) and the substrate is stone, with frequent riffles and pools and presence of leaf banks. During the study period, the streams showed a width ranging from 1.5 to 2.8 m and depth ranging from 0.4 to 0.9 m. During the experiment, the streams had well-oxygenated water, with mild temperatures (Table 1). The Dourado stream showed highest electrical conductivity values while Cravo stream had a highest concentration of nitrogen (Table 1).



Table 1. Environmental variables (mean  $\pm$  SE;  $n=3$ ) measured in Dourado, Horto and Cravo stream, during the experiment period. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

Variables	Streams (geographic coordinates)		
	Dourado (27°36'7.5''S; 52°16'12.6''O)	Horto (27°43'1.7''S; 52°18'30''O)	Cravo (27°36'50''S; 52°14'01''O)
Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	10.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
Temperature (°C)	20.2 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	18.7 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	20.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Conductivity ( $\mu$ S cm <sup>-1</sup> )	16.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	5.4 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
Turbidity (NTU)	6.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	5.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
pH	6.9 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	7.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Total nitrogen (mg L <sup>-1</sup> )	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
Total carbon (mg L <sup>-1</sup> )	4.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Total inorganic carbon (mg L <sup>-1</sup> )	10.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

### Experimental design

The field experiment lasted 30 days and was conducted during the summer, from December 2013 to January 2014. The experimental design was equally established in the three streams. We used  $3 \pm 0.1$  g of dried leaves of *N. megapotamica* and *C. tenella* for mounting 48 litter bags with 10 mm mesh size (15 x 20 cm). The litter bags were randomly affixed in the streams in locations with moderate or no currents, which propitiated leaf accumulation. After 15 and 30 days of incubation, three litter bags of each species were randomly taken from each stream and carried to the laboratory. The samples were washed over a 0.25 mm sieve to remove sediment and invertebrates associated with the detritus. The *Phylloicus* were identified by using taxonomic keys in the genus level (Pes et al., 2005; Mugnai et al., 2010).

## Laboratory approach - Consumption and preference of a common shredder

### *Phylloicus* sample

Specimens of *Phylloicus* were collected in a 1st order stream (located at 29°39'49" S, 53°44'34" W) using a hand net and visual search across the accumulated leaf litter. The specimens were carried to the laboratory in a refrigerated cooler containing leaves and a little water from the stream. In the laboratory, the samples were acclimated for a period of 24 hours (12L:12D photoperiod) into individual compartments, on a fine gravel substrate and in filtered water from the stream (using a 6 µm pore size filter), without feeding and under controlled temperature (18°C). Only 5th instar larvae were used, which included specimens with a relation between body size and head capsule in the range 0.87 - 1.20 mm (Nolen and Pearson, 1992).

### Leaf Consumption Experiment

This experiment was conducted to verify that the organisms consumed the detritus of the species separately. Thirty *Phylloicus* larvae were used, which were placed individually in plastic cups (36 × 8 × 8 cm). Leaf discs (~60) were cut from them with a 12 mm Ø cork borer, avoiding primary and secondary veins. We arranged two treatments: 15 larvae were offered five discs of *N. megapotamica* and the other 15 larvae were offered five *C. tenella* discs. The cups were intended to try to simulate the natural environment, for they contained fine gravel as a substrate (about 1 cm) and 100 mL of water from the stream (filtered mesh size). In order to measure the loss of leaf mass due to leaching and the action of microorganisms, control discs were kept in fine mesh packets (500 µm) and affixed on the surface of the cups without the access of the animals. All discs offered were previously conditioned in the stream, in litter bags (500 µm mesh size), for seven days, so that leaching and the establishment of microorganisms occurred. The consumption experiment lasted seven days, and the discs were

replaced every time it remained approximately 30% of the original mass. The remaining discs (experimental and control) were dried in an oven (60°C for 48 hours) and weighed to determine the remaining dry mass. We subtracted the weight of the control discs of the experiment and calculated the consumption of shredders.

### Leaf Preference Experiment

This experiment was conducted to determine the feeding preference of *Phylloicus* when exposed to two species of leaf detritus with different microbial conditioning times. Each specimen of *Phylloicus* was kept in a plastic cup (the same type used in the consumption of experiment), with fine gravel substrate and containing 100 mL of filtered water from the stream. Were cut ~3000 leaf discs with a 12 mm Ø cork borer, avoiding primary and secondary veins. Fifty six replicas were established, containing one larva and the two species of detritus (*N. megapotamica* and *C. tenella*) under different microbial conditionings (0 - unconditioned, 7 and 14 days of exposure in the stream in litter bag with 500 µm mesh size), totaling six discs for each specimen. In order to measure the loss of leaf mass due to leaching and the action of microorganisms, control discs (one disc for each treatment) were kept in fine mesh packets (500 µm) and affixed on the surface of the cups without the access of the animals. The experiment lasted for seven days and the discs were replaced when there was about 30% of the original mass left. The replacement of the discs was made so that the specimens always had all available types of detritus. The remaining discs (experimental and control) were dried in an oven (60°C for 48 hours) and weighed to determine the remaining dry mass. We subtracted the weight of the control discs and calculated the preference of shredders.

## Data analyses

The chemical variables of water across the streams were compared by using an Analysis of Variance (one-way ANOVA) with Tukey test post hoc. The differences in the initial chemical composition of plant species were tested by a  $t$  test. The abundance of *Phylloicus* and the hardness of leaves (field experiment) for each plant species were compared by means of a three-way ANOVA, using as factors the streams and the time of incubation. The consumption data from the plant species in the laboratory experiment were compared by using a one-way ANOVA, using the conditioning time as a factor. The hardness of the leaves in the laboratory experiment was compared by using a  $t$  test. The abundance data were log-transformed ( $x+1$ ). All analyzes were performed on R software (R Core Team, 2012).

## Results

### Leaf traits

The initial physical and chemical characteristics of the plant species varied, with the exception of polyphenols and cellulose (Table 2). The leaves of *C. tenella* presented higher concentrations of nitrogen, magnesium and potassium. While the leaves of *N. megapotamica* had higher hardness, lignin, carbon, C:N ratio and calcium (Table 2). In the field experiment, the hardness of the *C. tenella* leaves was lower in all sampling times ( $F_{1,24} = 122.6$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 1a). In addition, for both plant species, we found that the immersion time of the leaves in the stream led to a steady reduction in hardness until the 30th day of incubation ( $F_{2,24} = 51.5$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 1A). The streams had no effect on the hardness of the leaves ( $F_{2,24} = 0.1$ ,  $P < 0.46$ ).

Table 2. Leaf characteristics (mean  $\pm$  SE) of the leaves of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* before incubation in the streams. C:N: Carbon:Nitrogen ratio. n.d: not detected; DM: dry mass

	<i>C. tenella</i>	<i>N. megapotamica</i>	<i>t</i> (df=8)	<i>P</i>
Hardness (kgf cm <sup>-2</sup> )	37.2 $\pm$ 2.1	49.2 $\pm$ 2.8	- 19.1	<0.001
% Nitrogen	2.2 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0	17.1	<0.001
% Carbon	46.5 $\pm$ 0.5	57.2 $\pm$ 0.2	- 9.1	0.006
C:N	20.4 $\pm$ 0.3	38.1 $\pm$ 0.5	19.0	<0.001
% Lignin	6.9 $\pm$ 1.0	29.5 $\pm$ 1.9	7.4	0.008
% Cellulose	7.8 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 0.0	1.7	0.117
Phenolic (DO g <sup>-1</sup> DM)	170.3 $\pm$ 5.9	167.2 $\pm$ 3.7	0.6	0.307
Calcium (mg g <sup>-1</sup> DM)	1.1 $\pm$ 0.0	3.8 $\pm$ 0.1	26.8	<0.001
Magnesium (mg g <sup>-1</sup> DM)	2.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	243.1	<0.001
Potassium (mg g <sup>-1</sup> DM)	6.8 $\pm$ 0.0	3.3 $\pm$ 0.0	382.0	<0.001
Sodium (mg g <sup>-1</sup> DM)	0.9 $\pm$ 0.0	n.d.	-	-

In the laboratory experiment, *C. tenella* leaves presented lower hardness during the period ( $t = 1.2$ ,  $df = 9$ ,  $P = 0.004$ ; Fig. 1B). However, the effect of immersion time on the hardness of *N. megapotamica* leaves was lower until the 7th day. However, after 14 days it showed a significant drop (Fig. 1B). The anatomical structures of both plant species were similar, but the cuticle of *N. megapotamica* is slightly thicker than the cuticle of *C. tenella* (Fig. 2A and 2B). The leaves of *C. tenella* are of a membranous and pilous (hairy) type while the leaves of *N. megapotamica* are of a coriaceous and glabrous (hairless) type.

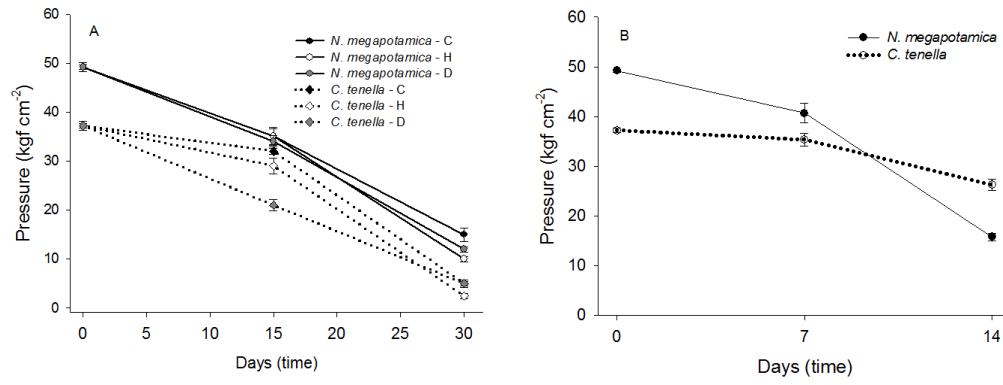


Fig.

1. Hardness values (mean  $\pm$  SE) for *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* in (A) during the period of experiment in the field and (B) during the period of experiment in the laboratory. C: Cravo stream; H: Horto stream; D: Dourado stream

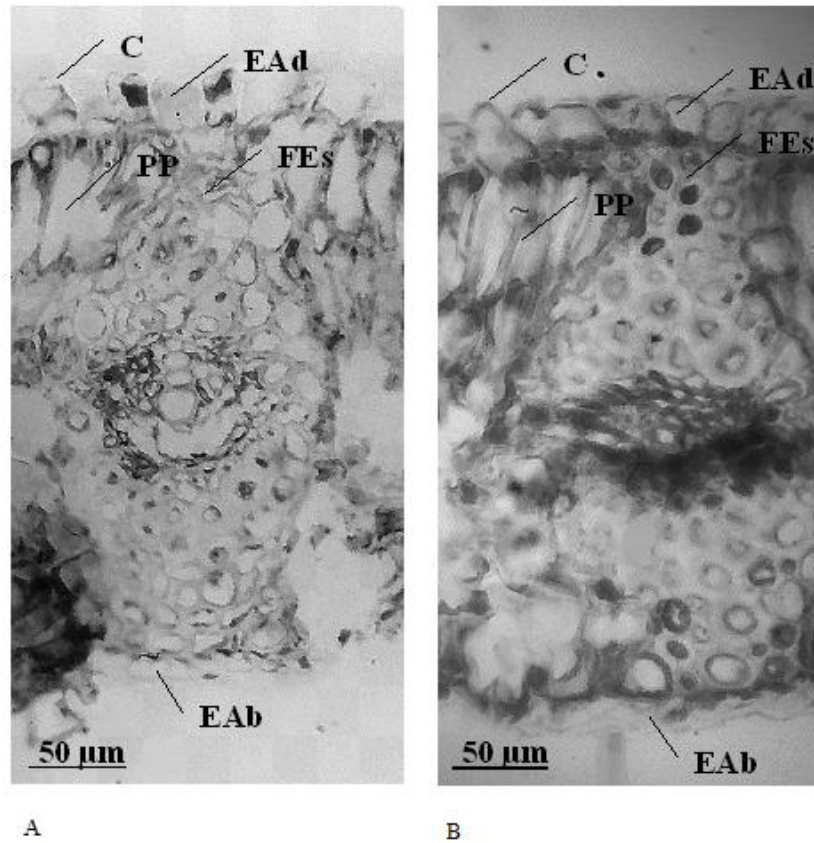


Fig. 2. Cross sections of leaves of (A) *Chusquea tenella* Ness and (B) *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. EAd: adaxial epidermis; EAb: abaxial epidermis; C: cuticle; SF: sclerenchyma fibers; PP: palisade parenchyma

### Field Approach – Abundance of shredder in streams

We observed variations in the abundance of *Phylloicus* between plant species (Table 3). But there was a variation in the abundance of organisms among the streams, depending on the incubation time of leaves (Table 3). We also observed a higher abundance of *Phylloicus* associated with *C. tenella* (75%), however, in the Horto stream, we found 79% total abundance of *Phylloicus* (Fig. 3).

Table 3. Three-way ANOVA results for the abundance of *Phylloicus* associated with leaves of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica*. df: degrees of freedom; SS: sum of squares.

In bold type: significant differences ( $P < 0.05$ ).

Anova three way	df	SS	F	P
Abundance of <i>Phylloicus</i>				
Leaf species	1	1.11	6.95	<b>0.014</b>
Stream	2	2.57	16.03	<b>0.001</b>
Time	1	0.26	1.65	0.210
Leaf species*Time	1	0.14	0.88	0.355
Leaf species*Stream	2	0.09	0.55	0.582
Time*Stream	2	1.51	9.43	<b>0.001</b>
Leaf species*Time*Stream	2	0.20	1.29	0.296
Residuals	24	0.16		

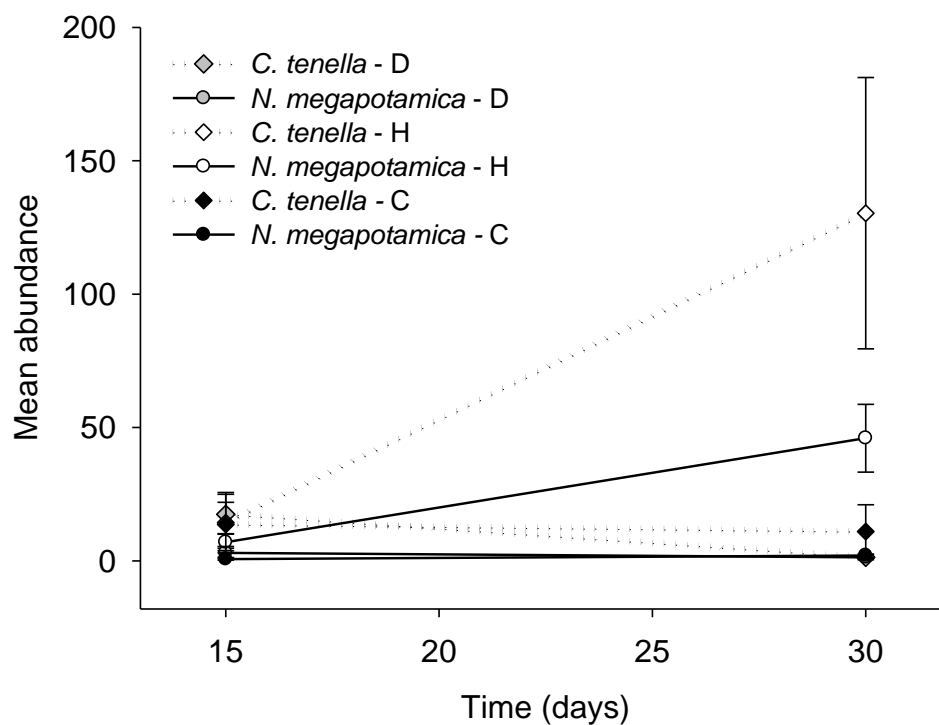


Fig. 3. Abundance (mean  $\pm$  SE) of *Phylloicus* associated with decaying leaves of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* for 15 and 30 days of incubation in Dourado (D), Horto (H), and Cravo (C) streams.



## Laboratory approach - Consumption and preference of a common shredder

In the experiment of preference, the *Phylloicus* preferred having *N. megapotamica* with 14 days of conditioning ( $F_{1,264} = 67.1$ ,  $P = 0.001$ ; Fig. 4b). Furthermore, we found that the *N. megapotamica* consumption was higher with the increase of microbial conditioning (species \* time:  $F_{2,264} = 12.6$ ,  $P = 0.001$ ; Time:  $F_{2,264} = 14.9$ ,  $P = 0.001$ ; Fig. 4A). Although the preference of the animals was by *N. megapotamica*, the *Phylloicus* specimens consumed higher amounts of *C. tenella* ( $386.5 \pm 1.1$  mg; mean  $\pm$  SE) than *C. tenella* and *N. megapotamica* ( $306.5 \pm 6.3$  mg) ( $t = 11.92$ ,  $df = 28$ ,  $P = 0.001$ ) (Fig. 4B). In behavioral terms, we noticed that some *Phylloicus* used *N. megapotamica* unconditioned discs to make repairs in their case. We also observed that *C. tenella* unconditioned discs were consumed by shredders.

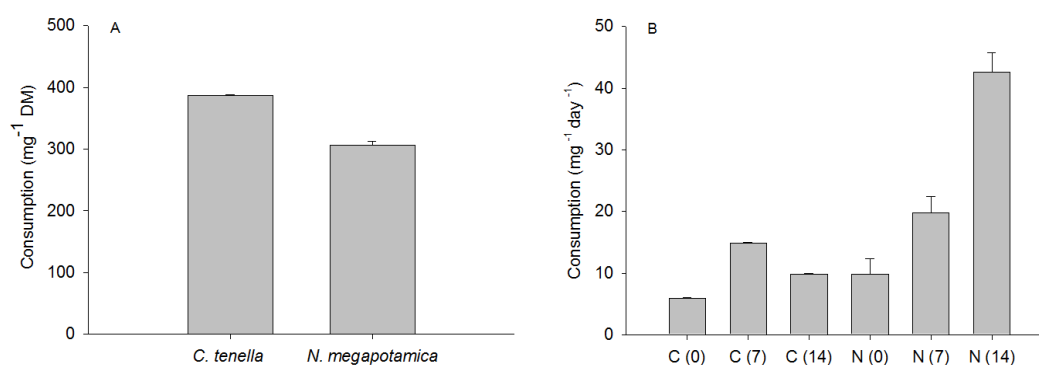


Fig. 4. (A) Consumption (mean  $\pm$  SE) of *Chusquea tenella* and *Nectandra megapotamica* by *Phylloicus* ( $n = 15$ ); (B) Consumption (mean  $\pm$  SE) of *C. tenella* and *N. megapotamica* by *Phylloicus* ( $n = 54$ ) at different incubation times in the stream. C: *C. tenella*; N: *N. megapotamica*; 0: unconditioned detritus; 7: detritus with 7 days conditioning; 14: detritus with 14 days conditioning; DM: dry mass

## **Discussion**

### **Leaf traits**

Plant species differ in their leaf traits characteristics. While the leaves of *C. tenella* are more palatable and nutritious, the leaves of *N. megapotamica* are harder, lignified and present a more resistant cuticle (Zanon et al., 2009). These leaf traits are essential to the process of fragmentation in the streams, since *C. tenella* will lose mass rapidly, for it is a resource more easily consumed by shredders, while *N. megapotamica* is a resource that will remain longer in the streams, so it will be consumed later by shredders. The leaf traits should be evaluated in studies on leaf fragmentation in tropical and subtropical streams because these sites present a continuum slow-fast, both in production and in the leaf fragmentation (Bakker et al., 2011). This occurs because the systems produce high-quality leaves at a low energy cost, as well as low-quality leaves with high structural costs (Wright et al., 2004). Thus, differences in leaf characteristics, which vary from plant species with hard leaves, with many defensive compounds and rich in nutrients govern the fragmentation rates in streams (Cornwell et al., 2008).

The hardness of species, both in the field and laboratory experiments, decreased with time. However, in the field experiment we monitored the hardness of the leaves for 30 days while in the laboratory experiment it was for 14 days. We observed that after 14 days the drop of hardness occurred more sharply in both species. This reduction in the hardness of leaves promotes a consequent reduction in the resistance to friction of leaves (Ratnarajah and Bermuta, 2009). Thus, the detritus with increased immersion time in the stream becomes softer and more palatable for shredders (Ligeiro et al., 2010; Biasi et al., 2013).

### **Field Approach – Abundance of shredder in streams**

In this study, we found a variation in the abundance of shredders among leaf litter species and streams at the end of the experiment. The abundance of *Phylloicus* was higher on

*C. tenella* leaves throughout the field experiment. Based on the leaf traits previously quantified in the experiments, these leaves are more palatable. The detritus of *C. tenella* had a higher amount of nitrogen and a lower C:N ratio, lignin, and lower hardness in the whole experiment. It is known that there is greater shredder density associated with decaying leaves with better nutritional quality (Rincón and Martínez, 2006; Graça and Cressa, 2010; Garcia et al., 2012; Bruder et al., 2014; König et al., 2014). As well as a negative correlation between fragmentation rates and leaf hardness (Abelho, 2008; Li et al., 2009) and the quantity of lignin (Wright and Covich, 2005), which are important physical attributes to promote the resistance of the leaves (Ratnarajah and Barmuta, 2009). Thus, the higher abundance of *Phylloicus* associated with leaves of *C. tenella* is related to leaf traits.

While we observed a decrease in the abundance of *Phylloicus* in the other streams after 30 days of the experiment, the Horto stream showed an increase in abundance during this period for both plant species. This variability found in the abundance of *Phylloicus* is related to the decrease of hardness in leaves on the 30th experiment day, especially in *C. tenella*. The Horto stream, despite its geological and physical-chemical characteristics being similar to the other streams, has the smallest width (visual observation). This feature is important for low-order streams, since it determines the speed of the current, water temperature and amount of accumulated organic matter, a fact that influenced the abundance of *Phylloicus* in Texas streams (Norwood and Stewart, 2002). The leaf traits, in particular, the hardness of the leaves, are influenced by current velocity, due to greater physical abrasion, thus lowering its resistance (Fonseca et al., 2012).

### **Laboratory approach - Consumption and preference of a common shredder**

Under laboratory conditions, the shredders were able to consume both species alone, and consumption was higher for *C. tenella*. Thus, the experiment of preference can be

interpreted with more credibility, because we assume that the consumption of one type of detritus is not dependent on the other (Canhoto et al., 2005). The leaves of *C. tenella* are a highly nutritious resource for *Phylloicus*, for they provide important nutrients for its development. Moreover, they require a lower energy cost from the larvae, once the leaves are soft and easily digested (Graça, 2001). For this test, we used discs which were previously conditioned in streams for seven days.

In the essay on the preference, the shredders, initially, consumed preferably the less palatable species (*N. megapotamica*). However, they preferred leaves with 14 days of incubation, which showed a significant reduction of hardness. In this case, the preference of *Phylloicus* for *N. megapotamica* is related to leaf traits. The decrease in hardness with increasing conditioning time explained the consumption pattern observed in *N. megapotamica*. There are reports that the microbial conditioning, especially fungal Hyphomycetes, promotes increased palatability of the detritus as it influences the breakdown of structural composites of the leaf and reduces its hardness (Pearson and Connolly, 2000; Graça et al., 2001; Aßmann et al., 2011). The fact that *Phylloicus* prefer *N. megapotamica* (14 days of conditioning) in the preference experiment and in the experiment with isolated species they consume more *C. tenella*, suggests that the *N. megapotamica* becomes palatable with time, because in the consumption experiment we used only disks with seven days of conditioning. Thus, our consumption essay did not allow the detritus of *N. megapotamica* to become palatable enough to be consumed by the *Phylloicus*. This does not happen with the *C. tenella* since it presents a palatable detritus from the start of the experiment.

In both experiments (field and laboratory) the shredders preferred detritus with reduced hardness and more conditioning time (field: *C. tenella*, 30 days; laboratory: *N. megapotamica*, 14 days), i.e., they seem to be determining factors influencing the choice of the *Phylloicus*. These parameters are interrelated, it is understood that the hardness of the

leaves tends to decrease, as microbial colonization is established, which was observed in the leaves of both species (Foucreau et al., 2013). The unconditioned leaves of *C. tenella* were consumed by the *Phylloicus* while the unconditioned leaves of *N. megapotamica* were used only to make repairs in case. This corroborates the fact that the *N. megapotamica* is a low-quality resource and more resistant and it was only consumed by *Phylloicus* when reduced its hardness and increased its conditioning time. As for the *C. tenella*, because of its high initial quality, it was consumed even without being conditioned by the microbial community.

The amount of nitrogen in the leaves can also be changed with the time of exposure in the streams since the fungi add nutrients to the detritus in their colonization (Graça, 2001). However, we did not measure the chemical characteristics of the leaves during the decomposition process, so it would be interesting in future studies to monitor the leaves characteristics (chemical and physical) throughout the process. Other factors which were not pondered in this study were the pressures suffered in the natural environment (e.g., predation risk) that have not been extended to the laboratory essays.

Leaf anatomical structures were similar between the plant species. We did not verify a differentiated consumption by shredders, as noted in Casotti et al. (2015), where shredders initiated consumption by the abaxial surface of the leaves, to avoid their cuticles. We only noticed that the shredders bypassed the central veins of the disks to avoid the harder and lignified parts, comprising sclerenchyma fibers (according to Casotti et al., 2015).

Laboratory studies have shown that shredders prefer to consume conditioned leaves (Chung and Suberkropp, 2009), with higher nitrogen content (Rincón and Martínez, 2006; Cassotti et al., 2015) and lower hardness (Li et al., 2009). As for the case-building, they prefer leaves with greater hardness and lignin (Cerezer et al., 2016) and increased content of polyphenols (Moretti et al., 2009). This is in line with our results, since we observed that those *Phylloicus* which used disks for repairs in the case, chose for this activity only the

leaves of lower quality and higher hardness and used for consumption the leaves of better quality.

In this study, we found evidence in the field and laboratory that the *Phylloicus* are selective in relation to food. These organisms select detritus with reduced hardness and conditioned by the microbial community. In our study, the leaf traits characteristics of the species explained the relation of shredders with the detritus, even experiencing a reversal of preference in the field experiment (*C. tenella* had higher association) when compared to the laboratory experiment (*N. megapotamica* was the one preferred by shredders). In conclusion, our results indicate that the leaf traits determine the association and preference of shredders. Future research should focus on determining whether the biomass of fungi affect the nutritional value of the leaves and the choice of shredders. Further studies are also needed to determine whether the preferences noticed in this study translate into different growth rates in *Phylloicus*. This study points to the importance of combining laboratory tests with field observations. And it supports the importance of conservation of the riparian vegetation of streams, for the availability of resources for subtropical shredders, and consequently, for the maintenance of functioning of ecosystems.

### **Acknowledgments**

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarships to C. Biasi and G. B. Cogo as well as Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity scholarship for S. Santos (proc. #311142/2014-1) and L. U. Hepp (proc. #471572/2012-8). We also thank Mr. Graciano Sonogo for opening his property for us to collect plant and animals species. We are grateful to Dra. Silvane Roman for assisting us with the analysis of leaf anatomy.

## References

- Abelho, M., 2008. Effects of leaf litter species on macroinvertebrate colonization during decomposition in a Portuguese stream. *Int. Rev. Hydrobiol.* 93, 358–371.
- Aßmann, C., Rinke, K., Nechwatal, J., Elert, E.V., 2011. Consequences of the colonisation of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. *Fresh. Biol.* 56, 839–852.
- Bataglia, O.C., Gallo, J.R., 1972. Determinação de cálcio e de magnésio em plantas por fotometria de chama de absorção. *Bragantia* 31, 59-74.
- Bakker, M.A., Carreño-Rocabado, G., Poorter L., 2011. Leaf economics traits predict litter decomposition of tropical plants and differ among land use types. *Funct. Ecol.* 25, 473–483.
- Biasi, C., Tonin, A.M., Restello, R.M., Hepp, L.U., 2013. Colonisation of leaf litter by Chironomidae (Diptera): influence of chemical quality and exposure duration in a Neotropical stream. *Limnologica* 43, 427–433.
- Boyero, L., Pearson, R.G., Dudgeon, D., Graça, M.A.S., Gessner, M.O., Albariño, R., Ferreira, V., Yule, C.M., Boulton, A.J., Arunachalam, M., Callisto, M., Chauvet, E., Ramírez, A., Chará, J., Moretti, M.S., Gonçalves, J.F.Jr., Helson, J.E., Chará-Serna, A., Encalada, A.C., Davies, J.N., Lamothe, S., Cornejo, A., Li A.O.Y., Buria, L.M., Villanueva, V.D., Zúñiga, M.C., Pringle, C.M., 2011. Global distribution of a key trophic guild contrasts with common latitudinal diversity patterns. *Ecology* 92, 1839–1848.

Boyero, L., Pearson, R.G., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Ramírez, A., Yule, C.M., Callisto, M., Pringle, C.M., Encalada, A.C., Arunachalam, M., Mathooko, J., Helson, J.E., Rincón, J., Bruder, A., Cornejo, A., Flecker, A.S., Mathuriau, C., M'Erimba, C., Gonçalves, J.F.J., Moretti, M., Jinggut, T., 2015. Leaf-litter breakdown in tropical streams: is variability the norm? *Fresh. Sci.* 34, 759–769.

Bruder, A., Schindler, M.H., Moretti, M.S., Gessner, M.O., 2013. Litter decomposition in a temperate and a tropical stream: the effects of species mixing, litter quality and shredders. *Fresh. Biol.* 59, 438–449.

Canhoto, C., Graça, M.A.S., 1999. Leaf barriers to fungal colonization and shredders (*Tipula lateralis*) consumption of decomposing *Eucalyptus globulus*. *Microb. Ecol.* 37, 163–172.

Canhoto, C., Graça, M.A.S., Bärlocher, F., 2005. Feeding preferences. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O. (Eds), *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*. pp. 297-302.

Casotti, C.G., Kiffer, W.P.Jr., Moretti, M.S., 2015. Leaf traits induce the feeding preference of a shredder of the genus *Triplectides kolenati*, 1859 (Trichoptera) in an Atlantic Forest stream, Brazil: a test with native and exotic leaves. *Aquatic Insects* 36, 43–52.

Cerezer, C., Biasi, C., Cogo, G.B., Santos, S., 2016. Avoid predation or take risks in basic activities? Predator–prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. *Mar. Freshwater Res.* [dx.doi.org/10.1071/MF15278](https://doi.org/10.1071/MF15278).



Cheshire, K., Boyero, L., Pearson, R.G., 2005. Food webs in tropical Australian streams: shredders are not scarce. *Fresh. Biol.* 50, 748–769.

Chung, N., Suberkropp, K., 2009. Contribution of fungal biomass to the growth of the shredder, *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). *Fresh. Biol.* 54, 2212–2224.

Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H., Amatangelo, K., Dorrepaal, E., 2008. Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecol. Lett.* 11, 1065–1071.

Cuffney, T.F., Wallace, J.B., Lugthart, G.J., 1990. Experimental evidence quantifying the role of benthic invertebrates in organic matter dynamics of headwater streams. *Fresh. Biol.* 23, 281–299.

Flindt, M.R., Lillebo, A.I., 2005. Determination of total nitrogen and phosphorus in leaf litter. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O. (Eds), *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, pp. 53-59.

Fonseca, A.L.S., Bianchini, I.Jr., Pimenta, C.M.M., Soares, C.B.P., Mangiavacchi, N., 2013. The flow velocity as driving force for decomposition of leaves and twigs. *Hydrobiologia* 703, 59–67.

Foucreau, N., Puijalon, S., Hervant, F., Piscart, C., 2013. Effect of leaf litter characteristics on leaf conditioning and on consumption by *Gammarus pulex*. *Fresh. Biol.* 58, 1672–1681.

Graça, M.A.S., Cressa, C., Gessner, M.O., Feio, M.J., Callies, K.A., Barrios, C., 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Fresh. Biol.* 46, 947–957.

Graça, M.A.S., 2001. The role of invertebrates on leaf decomposition in streams: a review. *Int. Rev. Hydrobiol.* 86, 383–393.

Graça, M.A.S., Cressa, C., 2010. Leaf quality of some Tropical and Temperate tree species as food resource for stream shredders. *Int. Rev. Hydrobiol.* 95, 27–41.

Garcia, L., Richardson, J.S., Pardo, I., 2012. Leaf quality influences invertebrate colonization and drift in a temperate rainforest stream. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 69, 1663–1673.

Going, B.M., Dudley, T.L., 2008. Invasive riparian plant litter alters aquatic insect growth. *Biological Invasions* 10, 1041–1051.

Gonçalves, J.F.Jr, Rezende, R.S., Gregório, R.S., Valentin, G.V., 2014. Relationship between dynamics of litterfall and riparian plant species in a tropical stream. *Limnologica* 44, 40–48.

König, R., Hepp, L.U., Santos, S., 2014. Colonisation of low- and high-quality detritus by benthic macroinvertebrates during leaf breakdown in a subtropical stream. *Limnologica* 45, 61–68.

Li, A.O.Y., Ng, L.C.Y., Dudgeon, D., 2009. Effects of leaf toughness and nitrogen content on litter breakdown and macroinvertebrates in a tropical stream. *Aquatic Science* 71: 80–93.

Ligeiro, R., Moretti, M.S., Gonçalves, J.F.Jr., Callisto, M., 2010. What is more important for invertebrate colonization in a stream with low-quality litter inputs: exposure time or leaf species? *Hydrobiologia* 654, 125–136.

Mathuriau, C., Chauvet, E., 2002 Breakdown of leaf litter in a neotropical stream. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 21, 384–396.

Moretti, M.S., Loyola, R.D., Becker, B., Callisto, M., 2009. Leaf abundance and phenolic concentrations codetermine the selection of case-building materials by *Phylloicus* sp. (Trichoptera, Calamoceratidae). *Hydrobiologia* 630, 199–206.

Mugnai, R., Nessimian, J.L., Baptista, D.F., 2010. Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro. Technical Books Editora, Rio de Janeiro.

Norwood, J.C., Stewart, K.W., 2002. Life history and case-building behavior of *Phylloicus ornatus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in two spring-fed streams in Texas. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95, 44–56.

Nolen, J.A., Pearson, R.G., 1992. Life history studies of *Anisocentropus kirramus* Neboiss (Trichoptera: Calamoceratidae) in a tropical Australian rainforest stream. *Aquatic Insects* 14, 213–221.

Nolen, J.A., Pearson, R.G., 1993. Factors affecting litter processing by *Anisocentropus kirranus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from an Australian tropical rainforest stream. *Fresh. Biol.* 29, 469–479.

Oliveira-Filho, A.T., Jarenkow, J.A., Rodal, M.N.J., 2006. Floristic relationships of seasonally dry forests of eastern South America based on tree species distribution patterns. In: Pennington, R.T, Lewis, G.P., Ratter, J.A. (Eds), *Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests. Plant Diversity, Biogeography and Conservation.* pp. 159–192.

Pes, A.M.O., Hamada, N., Nessimian, J.L., 2005. Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 49, 181–204.

Pettit, N.E., Davies, T., Fellman, J.B., Grierson, P.F., Warfe, D.M., Davies, P.M., 2012. Leaf litter chemistry, decomposition and assimilation by macroinvertebrates in two tropical streams. *Hydrobiologia* 680, 63–77.

Prather, A.L., 2003. Revision of the Neotropical caddisfly genus *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae). *Zootaxa* 275, 1–214.

Pearson R.G., Connolly, N.M., 2000. Nutrient enhancement, food quality and community dynamics in a tropical rainforest stream. *Fresh. Biol.* 43, 31–42.

R, Development Core Team, 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing.

Ratnarajah, L., Barmuta, L.A. 2009. The effects of leaf toughness on feeding preference by two Tasmanian shredders. *Hydrobiologia* 636, 173–178.

Rezende, R.S., Petrucio, M.M., Gonçalves, J.F.Jr., 2015. The Effects of Spatial Scale on Breakdown of Leaves in a Tropical Watershed. *PLoS One* 9.

Rincón, J., Martínez, I., 2006. Food quality and feeding preferences of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae). *J. North Am. Benthol. Soc.* 25, 209–215.

Schwarze, P., 1958. Phenole und chinome und die Bildung von Benzolkernen bei höheren Pflanzen. *Encycl. Plant Physiology* 10, 507–542.

Van Soest, P.J., 1993. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 46, 829–835.

Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R., Cushing, C.E., 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 37, 130–137.

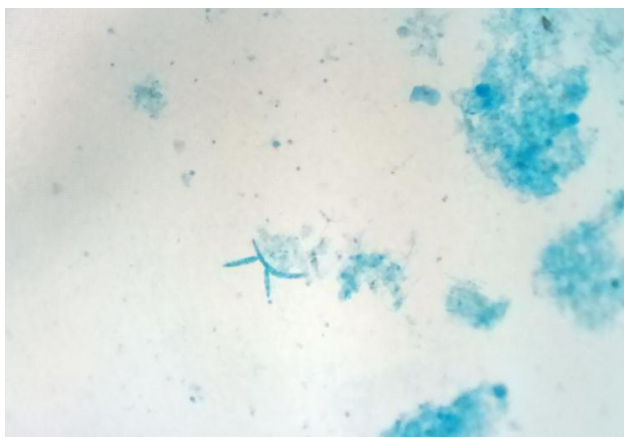
Wallace, J.B., Webster, J.R., 1996. The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology* 41, 115–139.

Wallace, J.B., Eggert, S.L., Meyer, J.L., Webster, J.R., 1997. Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277, 102–104.

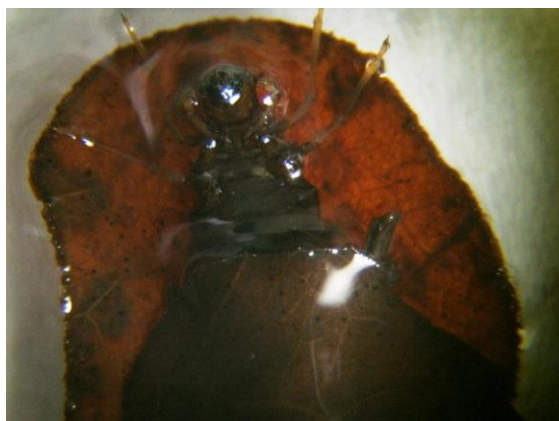
- Wantzen, K.M., Wagner, R., 2006. Detritus processing by invertebrate shredders: a neotropical temperate comparison. *J. North Am. Benth. Soc.* 25, 216–232.
- Westlake, D.F., 1963. Comparison of plant productivity. *Biological Review* 38, 385–425.
- Wright, M.S., Covich, A.P., 2005. Relative importance of bacteria and fungi in a tropical headwater stream: leaf decomposition and invertebrate feeding preference. *Microb. Ecol.* 49, 536–546.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821–827.
- Yule, C.M., Leong, M.Y., Liew, K.C., Ratnarajah, L., Schmidt, K., Wong, H.M., Pearson, R.G., Boyero, L., 2009. Shredders in Malaysia: abundance and richness are higher in cool upland tropical streams. *J. North Am. Benth. Soc.* 28, 404–415.
- Zanon, M.M.F., Goldenberg, R., Moraes, P.L.R., 2009. O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23, 22–35.

## CAPÍTULO 2

### ATIVIDADE MICROBIANA E DE FRAGMENTAÇÃO EM PLANTAS C<sub>3</sub> E C<sub>4</sub> EM UM RIACHO SUBTROPICAL



EXEMPLAR DE *Tricladium splendens*, UM FUNGO REGISTRADO NA REGIÃO SUBTROPICAL.



EXEMPLAR DE *Phylloicus*, UM FRAGMENTADOR TÍPICO DA REGIÃO SUBTROPICAL.

Artigo formatado segundo as normas da MDT 2015 - UFSM

**Atividade microbiana e de fragmentação em plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> em um riacho subtropical**

Cristiane Biasi<sup>1</sup>, Gláucia Bolzan Cogo<sup>1</sup>, Luiz U. Hepp<sup>2</sup>, Sandro Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Departamento de Ecologia e Evolução, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, prédio 17, sala 1104, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Avenida Sete de Setembro, 1621, CEP 99709-910, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Resumo**

O material alóctone, composto por detritos vegetais, especialmente por folhas, constitui a principal fonte de energia que sustenta as cadeias tróficas de riachos florestados. Reconhecer a importância relativa das diferentes fontes de energia que suportam os ambientes aquáticos é fundamental para a compreensão da dinâmica destes ecossistemas. Assim, nós investigamos se o carbono C<sub>4</sub> pode ser consumido e assimilado por fragmentadores, e se existe alguma preferência dos organismos por carbono C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub>. Além disso, nós testamos se os fungos hifomicetos têm sua composição e atividade de esporulação influenciadas pelo carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Para tanto, utilizamos *Nectandra megapotamica* como exemplar de espécie com via metabólica de fotossíntese C<sub>3</sub> e *Paspalum urvillei* como exemplar de espécie C<sub>4</sub>. Realizamos experimentos de consumo e preferência alimentar de *Phylloicus* e *Aegla longirostri* por carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> sob diferente condicionamento microbiano, analisamos a assinatura isotópica



dos fragmentadores e comparamos a atividade e riqueza dos Hifomicetos em cada detrito vegetal. Os fragmentadores consumiram em maior quantidade o carbono C<sub>4</sub>, em detrimento do C<sub>3</sub>, embora tenha ocorrido baixa assimilação deste carbono nos tecidos dos animais. O maior consumo das folhas C<sub>4</sub> está associado à baixa quantidade de lignina e às altas taxas de atividade microbiana neste detrito. A comunidade de Hifomicetos foi sensível às diferenças físicas entre as espécies e promoveu maior palatabilidade dos detritos C<sub>4</sub> para o consumo dos fragmentadores. A espécie C<sub>3</sub> contribuiu com ~76% para a dieta dos *Phylloicus* e ~57% para *A. longirostri*. Enquanto que a espécie C<sub>4</sub> contribuiu ~24% para *Phylloicus* e ~44% para *A. longirostri*. Estes resultados sugerem que a comunidade de hifomicetos e fragmentadores são correlacionadas com a vegetação composta especialmente por arbóreas, que consistem de carbono C<sub>3</sub>.

**Palavras-chave:** *Aegla longirostri*. C:N. Isótopos estáveis. *Phylloicus*. Preferência alimentar.

Vegetação ripária

## **Introdução**

O modelo de fluxo de energia mais utilizado em riachos é o *River Continuum Concept* (VANNOTE et al., 1980), o qual prediz que a principal fonte de carbono de riachos florestados provem de matéria orgânica alóctone. Estes riachos são sombreados e majoritariamente apresentam metabolismo heterotrófico, uma vez que a produção primária é limitada (ABELHO, 2001; GRAÇA et al., 2015a). Sendo assim, o material alóctone, composto por detritos vegetais, especialmente por folhas, torna-se a principal fonte de energia que sustenta as cadeias tróficas nestes ambientes (BENFIELD 1997; GONÇALVES & CALLISTO, 2013). Este material alóctone entra nos riachos de maneira vertical (caindo diretamente da copa das árvores) ou horizontal (entrando indiretamente pela lateral das margens) e passa pelo processo de decomposição, desde sua queda até sua incorporação na produção secundária (GESSNER et al., 1999).

A vegetação ripária dos riachos subtropicais é considerada rica em espécies e gera constante entrada de material alóctone ao longo do ano (CHESHIRE et al., 2005; GONÇALVES & CALLISTO, 2013), mesmo apresentando variação sazonal (COGO & SANTOS, 2013; GONÇALVES & CALLISTO, 2013; LISBOA et al., 2015). Recentes estudos têm mostrado que as comunidades aquáticas são relacionadas com a composição e quantidade de bancos de folhas em riachos, que por sua vez estão relacionadas à composição e estrutura da vegetação ripária (LIMA & GONÇALVES, 2015; FERREIRA et al., 2016). Tendo em vista que as práticas agrícolas, sobretudo a introdução de monoculturas, têm levado à perda e substituição de vegetação, inclusive em zonas ripárias, o resultado deve ser a alteração da quantidade e qualidade da matéria alóctone. Consequentemente, as comunidades e o funcionamento dos processos ecológicos em riachos também serão alterados (CORBI & TRIVINHO-STRIXINO, 2006; CORBI & TRIVINHO-STRIXINO, 2008; BELTRÃO et al., 2009; CASATTI et al., 2009; PRAMUAL & KUVANGKADILOK, 2009, ZHANG et al., 2010).

As principais monoculturas que têm avançado nas zonas ripárias consistem de espécies com via metabólica  $C_4$ , como gramíneas (CLAPCOTT & BUNN, 2003; LEITE-ROSSI & TRIVINHO-STRIXINO, 2012). As plantas  $C_4$  diferem essencialmente das plantas  $C_3$  pelo mecanismo de fotossíntese. Além disso, alguns estudos têm relatado baixa qualidade nutricional (disponibilidade de nutrientes) e restrições físicas devido a anatomia Kranz, típica de  $C_4$  (CASWELL & REED, 1976; SCHIERS et al., 2001). MARTINELLI et al. (1999) confirmaram que mudanças na composição da vegetação ribeirinha alteram a composição da matéria orgânica particulada, especialmente por substituição de espécies  $C_3$  por espécies  $C_4$ . CLAPCOTT & BUNN (2003), por sua vez, investigando a participação de espécies  $C_4$  na alimentação de um fragmentador, registraram uma baixa contribuição de gramíneas na cadeia alimentar de riachos florestados.

Na região Subtropical da América do Sul, *Phylloicus* (Trichoptera, Calamoceratidae) e *Aegla* (Decapoda, Anomura) são os principais fragmentadores encontrados em riachos (COGO & SANTOS, 2013; BIASI et al., 2016; TONELLO et al., 2016). Estes organismos contribuem para a manutenção e funcionamento da cadeia alimentar de pequenos riachos florestados. Os *Phylloicus* são importantes dentre os invertebrados fragmentadores devido a seu tamanho corporal quando comparados a outras espécies, o que resulta em alta taxa de consumo (GRAÇA, 2001; TONIN et al., 2014; REZENDE et al., 2014). Este gênero é encontrado em folhas submersas e usa detrito vegetal como recurso alimentar e para a construção de seus casulos (GRAÇA, 2001; MORETTI et al., 2009). A espécie *Aegla longirostri* pertence a um grupo endêmico da região sulamericana meridional (BOND-BUCKUP et al., 2008) e é reconhecido como importante estruturador das comunidades aquáticas (COGO et al., 2014; CEREZER et al., 2016), além de participar da decomposição foliar desses riachos (COGO & SANTOS, 2013). Embora não seja exclusivamente

fragmentador, *A. longirostri* é também caracterizado como macroconsumidor e pode ser predador de larvas de insetos (SANTOS et al., 2008)

Além dos fragmentadores, os fungos decompositores também têm papel importante na decomposição foliar, uma vez que usam tecidos de plantas mortas como fonte de energia (GULIS, 2001; GRAÇA et al., 2015b). A atividade microbiana, especialmente dos fungos Hifomicetos, podem beneficiar os invertebrados fragmentadores: (i) melhorando a qualidade do detrito pela acumulação de biomassa fúngica, (ii) digerindo compostos estruturais nos tecidos foliares e (iii) servindo diretamente de alimento para os fragmentadores (ARSUFFI & SUBERKROPP, 1988; GRAÇA et al., 2001; GULIS, 2001). Experimentos de laboratório têm mostrado que as taxas de alimentação dos fragmentadores também são influenciadas pelo tipo de espécie vegetal (CANHOTO & GRAÇA, 1995), temperatura da água (NOLEN & PEARSON, 1993), qualidade química e física das folhas (GRAÇA & POQUET, 2014; CASOTTI et al., 2015; BIASI et al. Submetido – Capítulo I) e a presença de predadores (REZENDE et al., 2014).

Reconhecer a importância relativa das diferentes fontes de energia que suportam o ambiente aquático é fundamental para a compreensão da dinâmica deste ecossistema, pois o tipo e a quantidade de energia disponíveis moldam as comunidades aquáticas e regulam a produção secundária (WALLACE et al., 1997; LEBERFINGER et al., 2011). Pouco se sabe sobre os efeitos de espécies vegetais do tipo  $C_4$  nas cadeias alimentares de ambientes aquáticos subtropicais, mesmo considerando-se que as gramíneas são frequentemente as espécies mais produtivas e conspícuas nesta região (RAVEN, 2014). Aliado a este fato, não existe estudo sobre o efeito da via metabólica das espécies vegetais na comunidade microbiana, responsável pelo condicionamento do detrito. Assim, investigar a atividade microbiana e de fragmentação frente a espécies  $C_3$  e  $C_4$  pode elucidar cenários futuros sobre o

processo de decomposição associado ao avanço de gramíneas e monoculturas nas zonas ripárias subtropicais.

Visando buscar respostas a estas questões, nós realizamos um experimento fatorial de laboratório para testar se o carbono C<sub>4</sub> pode ser consumido e assimilado por fragmentadores, e se existe alguma preferência dos organismos por carbono C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub>. Além disso, nós testamos se os fungos hifomicetos têm sua composição e atividade de esporulação influenciadas pelo carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Para testar nossas hipóteses utilizamos *Nectandra megapotamica* como exemplar de espécie com via metabólica de fotossíntese C<sub>3</sub> e *Paspalum urvillei* como exemplar de espécie C<sub>4</sub>. Com base em estudo de CLAPCOTT & BUNN (2003) nossa primeira hipótese é que os fragmentadores irão consumir e assimilar mais as folhas da espécie C<sub>3</sub> devido a sua familiaridade com este tipo de carbono, que é oriundo de espécies arbóreas. Entretanto, a atividade dos hifomicetos poderá ser beneficiada pela diferença na qualidade nutricional das espécies vegetais (por exemplo, baixa quantidade de lignina), como já descrito em alguns estudos (GULIS, 2001; GRAÇA et al., 2015b). Assim, nossa segunda hipótese é que a via metabólica das plantas influenciará a atividade de fragmentação por via indireta, ou seja, a colonização fúngica poderá ser sensível às diferenças físicas e químicas resultantes da via metabólica C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub> e, assim, promoverá diferenças na palatabilidade das folhas. Também acreditamos que a comunidade de Hifomicetos irá colonizar as espécies de maneira diferenciada, devido a diferenças no substrato, como previsto por GULIS (2001).

## **Material e Métodos**

### *Amostragem das espécies vegetais*

As folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae) e *Paspalum urvillei* (Steudel) (Poaceae) foram coletadas em zonas ripárias da região, caracterizada pela Floresta Atlântica, durante o mês de abril de 2013. As amostragens foram feitas a partir da idade das

folhas para coincidir com o estado que elas entrariam naturalmente nos córregos. Portanto, as folhas de *N. megapotamica* foram amostradas senescentes, com coloração marrom. Enquanto que as folhas de *P. urvillei* foram coletadas com coloração variando de verde a amarelo (CLAPCOTT & BUNN, 2003). Ambas as espécies são nativas da América do Sul e a escolha foi baseada na sua ocorrência e abundância nas zonas ripárias dos riachos da região estudada. Todas as folhas coletadas foram secas ao ar em temperatura ambiente (~20°C/20 dias) até serem utilizadas nos experimentos. Aproximadamente 5 g de folhas de cada espécie foram destinadas a caracterização dos atributos físicos e químicos do detrito (ver abaixo).

#### *Atributos físicos e químicos do detrito*

Características físicas e químicas das espécies vegetais foram analisadas antes da realização dos experimentos. A medida de dureza das folhas foi quantificada com um penetrômetro construído com duas placas de acrílico com um pino de metal (2.5 mm) na vertical colado a um suporte de acrílico. Neste suporte o peso é ponderado com água em um becker e a pressão exercida no pino de metal é utilizada para perfurar uma folha (NOLEN & PEARSON, 1993). A concentração de nitrogênio das folhas foi quantificada seguindo o método de Kjeldahl (FLINDT & LILLEBO, 2005). Para a extração de polifenóis as amostras ficaram 24h em metanol 50% e após o material filtrado foi submetido ao reagente Folin Denis e carbonato de sódio. A concentração de polifenóis foi determinada em DO (densidade ótica) pela leitura das amostras em espectrofotômetro a 725 nm (SCHWARZE, 1958). A concentração de lignina e celulose seguiu metodologia de VAN SOEST (1993) que estima as fibras em detergente ácido.

O material inorgânico resultante da incineração foi diluído em HNO<sub>3</sub> (1 mol L<sup>-1</sup>) e analisado em espectrofotômetro de absorção atômica para a leitura dos íons Ca, Mg e K (para

a leitura de cálcio e magnésio foi acrescentado óxido de lantânio). O carbono das folhas foi estimado por espectrômetro de massas (Delta PlusXP, Thermofinnigan, Bremen).

#### *Amostragem dos fragmentadores*

Os espécimes de *Phylloicus* e *Aegla longirostri* utilizados nos experimentos foram coletados em um riacho de 1ª ordem localizado na região sul do Brasil (coordenadas centrais: 29°39'49"S; 53°44'34"W). As amostragens dos *Phylloicus* foram realizadas com auxílio de rede de mão e por procura visual entre o folhiço acumulado. Os espécimes de *Aegla* foram coletados com coletor do tipo covó utilizando como isca fígado de galinha. Os coletores ficaram 24 horas no riacho e após os organismos foram conduzidos até o laboratório em caixa de isopor. Ao chegar no laboratório os exemplares foram mantidos em compartimentos individuais, aeradas e com substrato de pedras finas (~1 cm) e água do riacho filtrada (filtro com 6 µm de porosidade). Os organismos foram aclimatados anteriormente aos experimentos por um período de 24 h para os *Phylloicus* (BOYERO et al., 2006; CEREZER et al., 2016) e sete dias para *A. longirostri* (DALOSTO & SANTOS 2011; CEREZER et al., 2016), sem alimentação, sob temperatura controlada (18°C) e em regime de 12 horas luz: 12 horas escuro. Foram amostrados 75 *Phylloicus* de 4º e 5º instares, que compreendiam exemplares com a relação entre o tamanho corporal e a cápsula cefálica entre 0,59 – 1,20 mm (NOLEN & PEARSON, 1992) e 45 machos de *A. longirostri* com comprimento médio da carapaça de  $19,07 \pm 0,41$  mm. Foram utilizados apenas machos adultos de *A. longirostri* para evitar o fator sexo no modelo experimental e por haver diferenças na dieta e assinatura isotópica de adultos e juvenis (BURRESS et al., 2013).

*Experimento de consumo foliar*

Este experimento foi realizado para garantir que os fragmentadores fossem consumir os detritos das espécies isoladas (CANHOTO et al., 2005). Foram utilizadas 30 larvas de *Phylloicus*, colocadas individualmente em copos de plástico (36 x 8 x 8 cm) com 100 mL de água do riacho filtrada (6 µm de porosidade) e 14 eglídeos, colocados em aquários individuais (18 x 12 x 20) com 700 mL de água do riacho filtrada (filtro com 6 µm de porosidade). Os recipientes tentavam simular o ambiente natural, contendo pedras finas (~1 cm) como substrato. Para metade dos animais (15 *Phylloicus* e sete eglídeos) foram oferecidos cinco discos (12 mm) de *N. megapotamica* (via C<sub>3</sub>) e para outra metade foram oferecidos cinco discos de *P. urvillei* (via C<sub>4</sub>). Para cada réplica foram mantidos discos controle fixados na superfície do recipiente para mensurar a perda de massa foliar ocorrida pela ação da água e pelos microrganismos. Os animais não tinham acesso aos discos controle. Todos os discos oferecidos foram previamente condicionados, no mesmo riacho que os animais foram coletados, em litter bags (500 µm de tamanho de malha) durante sete dias para promover a lixiviação e o estabelecimento dos microrganismos. O experimento de consumo teve duração de 10 dias e os discos foram repostos sempre que restavam aproximadamente 30% da massa inicial. Os discos remanescentes foram secos em estufa (60°C por 48 horas) e pesados para determinação da massa seca remanescente (MS) e para calcular as taxas de consumo dos fragmentadores.

*Experimento de preferência foliar*

Este experimento foi conduzido para determinar a preferência alimentar dos animais quando expostos a dois tipos de detritos foliares com diferentes tempos de condicionamento microbiano. Os indivíduos foram mantidos em recipientes individuais (*Phylloicus* em copos plásticos e *A. longirostri* em aquários) com substrato de pedras finas e água do riacho filtrada



(similar ao experimento de consumo). Foram estabelecidas 45 réplicas de *Phylloicus* e 27 de *A. longirostri*, cada uma contendo o fragmentador e dois tipos de detritos (*N. megapotamica* – C<sub>3</sub> e *P. urvillei* – C<sub>4</sub>) sob diferente tempo de condicionamento microbiano (7 e 14 dias de incubação em riacho, em litter bag de 500 µm de tamanho de malha), totalizando quatro discos para cada exemplar. Em cada recipiente foram fixados discos controle (um disco para cada tratamento) para mensurar a perda de massa foliar ocorrida pela ação da água e pelos microrganismos. O experimento durou oito dias para os *Phylloicus* e 21 dias para *A. longirostri* (CLAPCOTT & BUNN, 2003) e os discos eram repostos quando restavam aproximadamente 30% do inicial. A reposição dos discos foi feita para que os exemplares sempre tivessem todos os tipos de detritos disponíveis. Os discos foram secos em estufa (60°C por 48 horas) e pesados para determinar a massa seca remanescente e para calcular a preferência dos fragmentadores.

#### *Hifomicetos aquáticos*

A atividade microbiana foi determinada pela produção de conídios por Hifomicetos aquáticos, estimando a sua taxa de esporulação (GRAÇA et al., 2005). Para tanto, um conjunto de 15 discos de cada tratamento (via metabólica×tempo de condicionamento) foi acondicionado em frascos erlenmeyer (100 mL) com 40 mL de água filtrada do riacho (filtro de 6 µm de porosidade) em um agitador orbital (225 rotações min<sup>-1</sup>) por 48 horas, em temperatura controlada à 18°C e em regime de 12 horas luz:12 horas escuro. Após este período, a suspensão de conídios foi acondicionada em tubos falcon de 50 mL, fixadas com 2 mL de formaldeído 37% e estocadas no escuro até serem processadas. Para garantir uniformidade e homogeneidade dos conídios, foi adicionado 150 µL de Triton X-100 0,5 % em cada amostra, que permaneceram em agitador magnético. Uma alíquota da suspensão foi filtrada em filtro de membrana nitrato de celulose (25 mm Ø, 5 µm tamanho de poro;

Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany). Os filtros foram corados com azul tripan 0,05 % em ácido láctico 60 %, e os esporos foram contados e identificados em microscópio com aumento de 200× de acordo com GRAÇA et al. (2005). As taxas de esporulação, uma medida da atividade reprodutiva, foi expressa como n°. conidio liberado  $\text{mg}^{-1}$  MS  $\text{dia}^{-1}$  e a riqueza de espécies dos hifomicetos aquáticos como n°. espécies amostra<sup>-1</sup>.

### *Isótopos estáveis*

Para analisar o rastreamento das espécies C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> por meio de isótopos estáveis ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) foram utilizadas como fonte as espécies *N. megapotamica* e *P. urvillei* (n=5 de cada espécie), previamente secas (50°C por 48h) e trituradas (moinho de facas de 1 mm de malha). Também foram analisamos a assinatura isotópica de exemplares de *Phylloicus* e *A. longirostri* no meio natural (n=10 de cada táxon) e os exemplares utilizados no experimento de preferência alimentar (n=10 de cada táxon). Para analisar a assimilação nos tecidos dos fragmentadores, foi utilizado todo o corpo das larvas de *Phylloicus* e o músculo dos quelípodos de *A. longirostri*. Em seguida, o material foi congelado (-20°C/48h), secado (50°C/48h), pesado (folhas e tecidos dos fragmentadores) em balança de precisão e destinado à análise em espectrômetro de massas (Delta PlusXP, Thermofinnigan, Bremen). A determinação dos isótopos foi expressa em  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ . Um modelo misto foi utilizado para analisar a fonte assimilada pelos organismos no experimento de preferência:

$$P = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{consumidor}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{fonte B}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{fonte A}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{fonte B}}}$$

Onde P é a proporção da fonte (PETERSON & FRY, 1987; MARTINELLI et al., 2009).

### Análise dos dados

As variáveis físicas (dureza, lignina e celulose) e químicas (nitrogênio, carbono, razão C:N, polifenóis, cálcio, magnésio e potássio) foram comparadas entre as espécies vegetais por um Teste *t*. Para analisar a preferência alimentar dos fragmentadores entre detrito C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> foi calculado o consumo dos organismos descontando o peso dos discos controle dos discos consumidos, comparando-os por meio de uma análise ANOVA fatorial (fator: condicionamento microbiano). As taxas de esporulação e riqueza de espécies também foram comparadas com ANOVA fatorial (fator: condicionamento microbiano). As comparações de contrastes *a posteriori* foram realizadas por Teste Tukey. E as assinaturas isotópicas dos fragmentadores amostrados no ambiente natural foram comparadas com as assinaturas dos fragmentadores testados no experimento de preferência por meio de Testes *t*. Todas as análises foram realizadas no Software R (R CORE TEAM, 2010).

## Resultados

### Atributos físicos e químicos do detrito

As características físicas e químicas diferiram entre as espécies C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> (Tabela 1). As folhas de *N. megapotamica* apresentaram maior dureza, lignina e cálcio. Por outro lado, as folhas de *P. urvillei* apresentaram maiores concentrações de celulose, polifenóis, magnésio e potássio. Em relação aos atributos N, C e a razão C:N não houveram diferenças entre as espécies (Tabela 1).

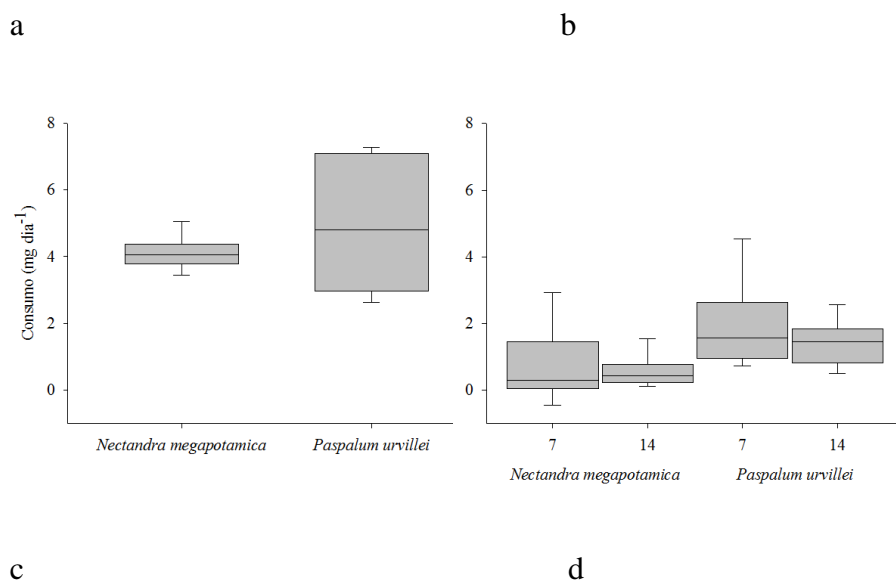
Tabela 1. Características foliares (média ± EP) de *Nectandra megapotamica* (via C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) antes da incubação nos riachos. C:N=razão Carbono: Nitrogênio. MS= massa seca; DO= densidade ótica.

	<i>Nectandra megapotamica</i>	<i>Paspalum urvillei</i>	t (n=3)	p
Dureza (kgf cm <sup>2</sup> )	49,2 ± 5,0	36,5 ± 1,5	-4,5	<0,001
% Lignina	29,5 ± 1,9	6,2 ± 1,0	- 10,4	0,002

% Celulose	6,4 ± 0,0	9,3 ± 0,8	3,3	0,039
% Nitrogênio	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0	- 2,0	0,054
% Carbono	50,3 ± 0,8	47,9 ± 2,3	1,9	0,094
C:N	33,5 ± 0,5	34,2 ± 1,0	0,3	0,126
Polifenóis (DO g <sup>-1</sup> MS)	167,3 ± 6,6	190,4 ± 2,3	- 5,5	0,003
Cálcio (mg g <sup>-1</sup> MS)	3,8 ± 0,2	1,1 ± 0,0	2,4	0,001
Magnésio (mg g <sup>-1</sup> MS)	0,2 ± 0,0	9,2 ± 0,0	6,9	0,002
Potássio (mg g <sup>-1</sup> MS)	3,3 ± 0,0	19,1 ± 0,1	3,6	<0,001

### Consumo e Preferência alimentar dos fragmentadores

Houve aceitação por parte dos animais de ambas as espécies vegetais e maior consumo da espécie C<sub>4</sub> (Figura 1a e 1c; Tabela 2). Os exemplares de *Phylloicus* consumiram 28,6 ± 3,4 mg MS da espécie C<sub>3</sub> e 34,9 ± 12,9 mg MS da espécie C<sub>4</sub>. Enquanto os exemplares de *A. longirostri* consumiram 15,8 ± 4,2 mg MS da espécie C<sub>3</sub> e 43,8 ± 1,8 mg MS da espécie C<sub>4</sub> (Figura 1a e 1c). No experimento de preferência alimentar (múltipla escolha) ambos os grupos apresentaram maior consumo da espécie C<sub>4</sub> (Figura 1b e 1d; Tabela 2). Porém, não observamos o mesmo padrão de alimentação entre os animais. Enquanto os *Phylloicus* consumiram mais a planta C<sub>4</sub> de sete dias de condicionamento (13,5 ± 0,54 mg MS; Tukey, p < 0,001) os eglídeos não fizeram distinção em relação ao condicionamento.



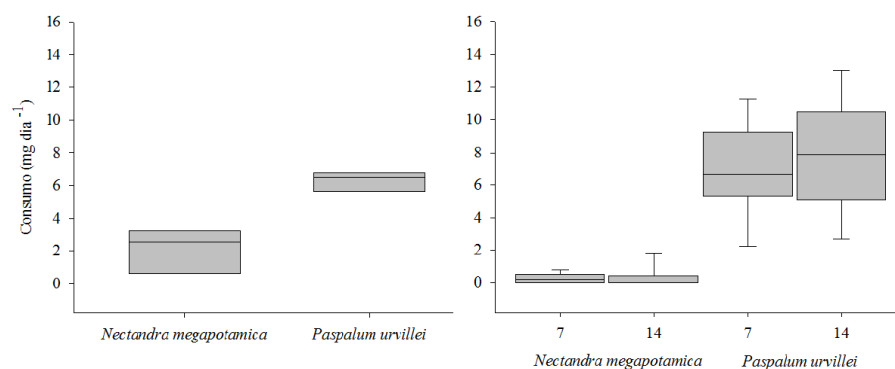


Figura 1. Valores de (a) consumo diário e (b) preferência alimentar (mg dia<sup>-1</sup>) de *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) por *Phylloicus* e (c) consumo e (d) preferência alimentar de *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) por *Aegla longirostri*.

Tabela 2. Valores do Teste *t* e Anova two-way para a comparação entre o consumo e preferência alimentar de *Nectandra megapotamica* (via C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (via C<sub>4</sub>) por *Phylloicus* e *Aegla longirostri*. GL=graus de liberdade

	<i>Phylloicus</i>			<i>Aegla longirostri</i>		
	GL	<i>T</i>	p	GL	<i>t</i>	p
<i>Consumo</i>						
Espécie	1	-1,57	<0,001	1	- 6,07	<0,001
<i>Preferência</i>						
		F	p	GL	F	p
Espécie	1	34,96	<0,001	1	391,49	<0,001
Tempo	1	8,10	0,04	1	0,01	0,97
Espécie × Tempo	1	0,59	0,41	1	0,47	0,49

### *Hifomicetos aquáticos*

A taxa de esporulação variou de 259,4 – 474,8 conidia mg<sup>-1</sup> MS d<sup>-1</sup> (Tabela 3). Houve maior taxa de esporulação na espécie C<sub>4</sub> em sete dias de condicionamento microbiano (Tabela 3 e 4). Um total de nove espécies de hifomicetos aquáticos foram encontrados (Figura 2). A riqueza de espécies foi maior na espécie C<sub>4</sub>, porém entre os dias de condicionamento foi similar (Tabela 4). As espécies *Clavariopsis aquatica*, *Heliscus submersus* e *Lunospora*

*curvula* foram as mais abundantes, representando 69% do total. A espécie *H. submersus* foi exclusiva da espécie C<sub>3</sub>, enquanto que *Tetracladium marchalianum* foi exclusiva da espécie C<sub>4</sub> (Figura 2).

Tabela 3. Valores (média±EP) de taxa de esporulação e riqueza de espécies dos hifomicetos aquáticos associados a *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) durante 7 e 14 dias de colonização. MS=massa seca.

	Tempo (dias)	Taxa de esporulação (no. conidia mg <sup>-1</sup> MS d <sup>-1</sup> )	Riqueza de espécies
<i>Nectandra megapotamica</i>	7	259,4 ± 33,6	5,7 ± 0,3
	14	295,1 ± 25,0	5,7 ± 0,3
<i>Paspalum urvillei</i>	7	474,8 ± 16,8	6,7 ± 0,3
	14	433,5 ± 14,0	7,7 ± 0,3

Tabela 4. Valores da Anova two-way para a Taxa de esporulação e Riqueza de espécies dos Hifomicetos aquáticos associados à *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>). GL=graus de liberdade

	GL	Taxa de esporulação		Riqueza de espécies	
		F	p	F	p
Espécie	1	112,15	<0,001	40,5	<0,001
Tempo	1	0,02	0,87	4,5	0,05
Espécie × Tempo	1	5,30	0,04	4,5	0,05

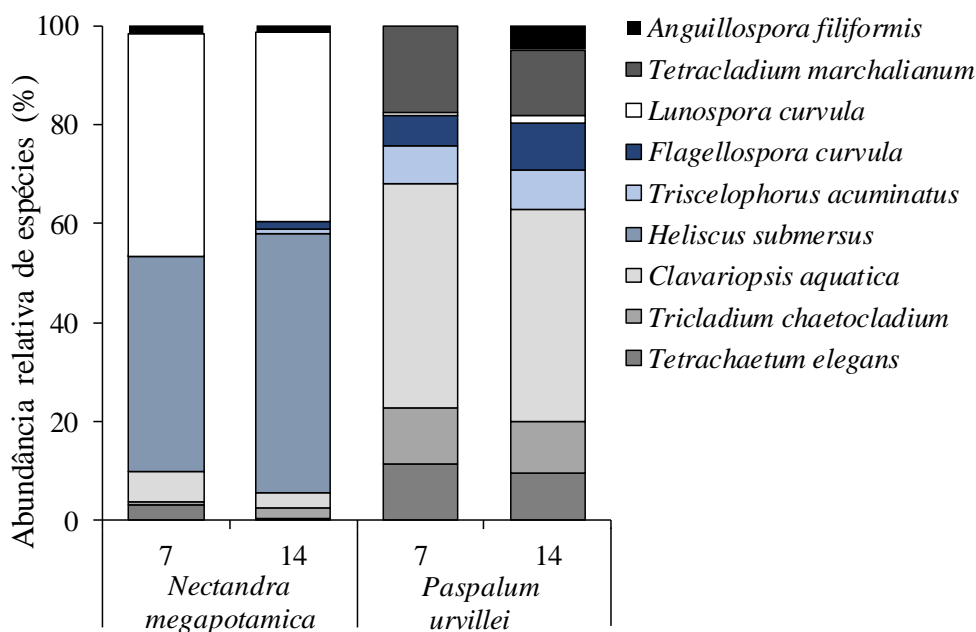


Figura 2. Abundância relativa das espécies de hifomicetos aquáticos associados a folhas de *Nectandra megapotamica* (C<sub>3</sub>) e *Paspalum urvillei* (C<sub>4</sub>) durante 7 e 14 dias de experimento.

#### Assimilação de carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> por *Phylloicus* e *A. longirostri*

A assinatura isotópica do carbono da espécie *N. megapotamica* foi de  $\delta^{13}\text{C}$   $-29,41 \pm 0,13\text{‰}$  e de *P. urvillei*  $\delta^{13}\text{C}$   $-16,04 \pm 0,07\text{‰}$  (Figura 3). Os *Phylloicus* do experimento alimentar de preferência apresentaram assinatura isotópica do carbono de  $\delta^{13}\text{C}$   $-26,48 \pm 0,19\text{‰}$  e os eglídeos  $\delta^{13}\text{C}$   $-23,71 \pm 0,25\text{‰}$ . O carbono dos animais do experimento diferiu dos amostrados em ambiente natural (*Phylloicus*:  $\delta^{13}\text{C}$   $-28,16 \pm 0,16\text{‰}$ ;  $F_{1,9} = 46,9$ ;  $p < 0,001$ ; *A. longirostri*:  $\delta^{13}\text{C}$   $-24,38 \pm 0,14\text{‰}$ ;  $F_{1,9} = 5,4$ ;  $p = 0,03$ ) (Figura 3).

Em relação a assinatura isotópica do nitrogênio, os eglídeos apresentaram assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$   $7,13 \pm 0,12\text{‰}$  (ambiente natural) e  $\delta^{15}\text{N}$   $7,22 \pm 0,09\text{‰}$  (testados em experimento de preferência), enquanto que os *Phylloicus* apresentaram  $\delta^{15}\text{N}$   $4,08 \pm 0,19\text{‰}$  (ambiente natural) e  $\delta^{15}\text{N}$   $3,82 \pm 0,33\text{‰}$  (testados em experimento de preferência). O modelo misto sugere que a espécie C<sub>3</sub> contribuiu com  $76,0 \pm 1,4\%$  (média  $\pm$  EP) para a dieta dos *Phylloicus* (oscilando de 69,6 – 81,0 %) e  $57,3 \pm 2,1\%$  para *A. longirostri* (oscilando de 51,8 – 72,2 %). Enquanto

que a espécie  $C_4$  contribuiu  $24,0 \pm 1,4\%$  para *Phylloicus* (variando de 19,0 – 30,3%) e  $44,3 \pm 2,0\%$  para *A. longirostri* (variando de 30 – 49%).

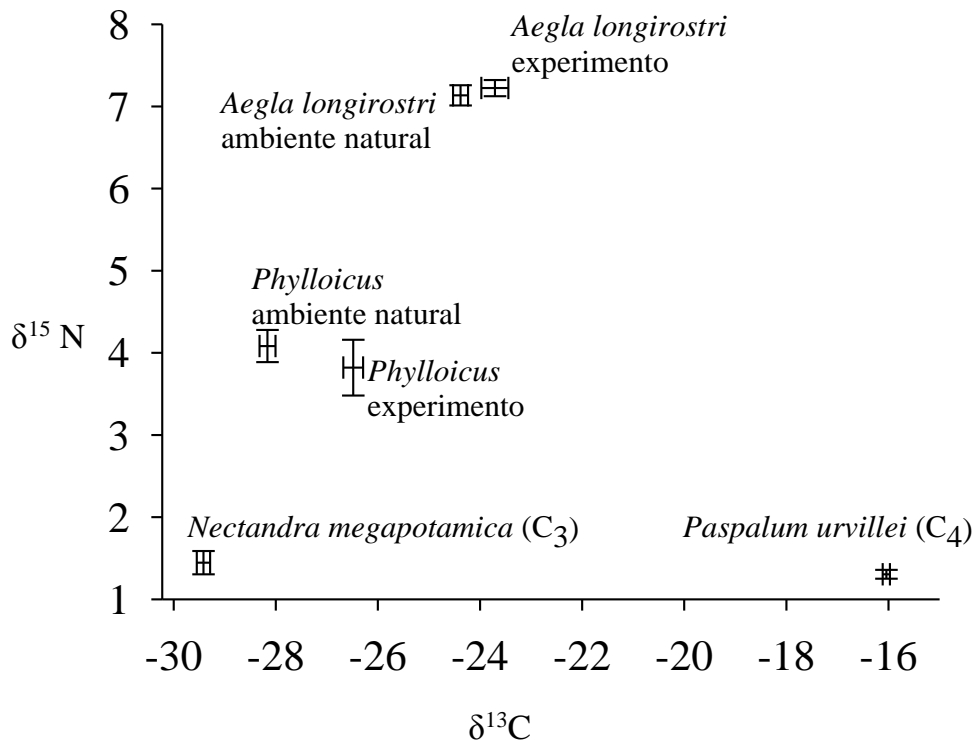


Figura 3. Assinatura isotópica de carbono ( $\delta^{13}C$ ) e nitrogênio e ( $\delta^{15}N$ ) estáveis das espécies vegetais *Nectandra megapotamica* ( $C_3$ ) e *Paspalum urvillei* ( $C_4$ ) e dos fragmentadores testados no experimento de preferência alimentar e os fragmentadores amostrados no ambiente natural.

## Discussão

Neste estudo investigamos o efeito da via metabólica ( $C_3$  ou  $C_4$ ) no consumo e preferência por organismos detritívoros na fragmentação foliar e na colonização por hifomicetos aquáticos em folhas em decomposição. Nós verificamos que, apesar de as espécies  $C_4$  serem consideradas largamente produtivas (FORSBERG et al., 1993;



SCHEFFER-BASSO et al., 2002), não contribuem na mesma medida, para a cadeia alimentar de riachos florestados que as plantas C<sub>3</sub>.

#### *Atributos físicos e químicos do detrito*

A qualidade química das espécies C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> diferiram, especialmente, em relação aos atributos físicos das folhas. É reconhecido que a composição química das folhas exerce efeito na sua decomposição (PETIT et al., 2012; BIASI et al., 2013; KÖNIG et al., 2014) e determina as taxas de alimentação dos fragmentadores e sua eficiência em converter matéria orgânica particulada em biomassa animal e outros produtos (como matéria orgânica particulada fina) (GRAÇA, 2001; CASOTTI et al., 2015). As folhas C<sub>4</sub> representaram um item alimentar mais macio e com menos compostos estruturais, como lignina. Apesar disso, apresentou maior concentração de polifenóis e de potássio. Baseados nestes atributos, as folhas de *P. urvillei* representaram um detrito mais palatável para os fragmentadores, tendo em vista que a resistência foliar é inversamente relacionada à sua dureza e quantidade de lignina. Desse modo, a ação dos invertebrados fragmentadores pode ter sido facilitada devido à redução de sua resistência e aumento de sua digestibilidade (GESSNER, 2005; TUFFI et al., 2009; BIASI et al., 2016).

Os compostos fenólicos são elementos secundários das plantas, com função defensiva contra herbivoria e patógenos, geralmente relacionados negativamente com a atividade de fragmentação (RINCÓN & MARTÍNEZ, 2008; ARDÓN & PRINGLE, 2008; MORETTI et al., 2009; GRAÇA & CRESSA, 2010). O íon K não é considerado um componente estrutural do tecido das plantas, mas atua como um macronutriente, juntamente com Ca e Mg, que podem ser relacionados com a perda de compostos solúveis e perda de massa das folhas em decomposição (SHIEH et al., 2008). Entretanto, os compostos fenólicos e os íons Mg, Ca e K são facilmente lixiviados nos primeiros dias da queda das folhas no riacho (perda de ~50% em

3-5 dias; TONIN et al., 2014), o que reduz o efeito inibitório destes compostos para os fragmentadores. Assim, ARDÓN et al. (2009) sugerem que os compostos secundários não têm papel direto na decomposição foliar em riachos pois são facilmente lixiviados.

#### *Consumo e preferência alimentar dos fragmentadores*

Os experimentos de consumo e preferência alimentar evidenciam claramente que os animais podem consumir tanto espécies  $C_3$  como espécies  $C_4$ , mas com preferência pelas folhas com via  $C_4$ , refutando nossa primeira hipótese. Contrariamente ao nosso estudo, CLAPCOTT & BUNN (2003) investigando o consumo de espécies  $C_3$  e  $C_4$  pelo fragmentador *Anisocentropus kirramus* encontraram baixo consumo de gramíneas em detrimento de folhas arbóreas, consumindo detrito  $C_4$  apenas na ausência de itens de origem  $C_3$ . Os autores ressaltam uma possível limitação dos fragmentadores em processar este tipo de detrito, e uma das explicações plausíveis é a falta de enzimas digestivas ou simbióticas, presentes em invertebrados terrestres que se alimentam de plantas  $C_4$  (CUMMINS & KLUG, 1979). CARVALHO & GRAÇA (2007) avaliaram a atividade alimentar do fragmentador *Sericostoma vittatum* frente a diferentes tipos de detrito, dentre eles, folhas da macrófita *Myriophyllum aquaticum* (via  $C_4$ ). Os autores identificaram capacidade do fragmentador em consumir a macrófita, mas evidenciaram maior consumo de folhas com via  $C_3$ .

CASWELL et al. (1973) levantaram a hipótese de que as plantas  $C_4$  constituem um recurso alimentar mais pobre para os herbívoros do que as plantas  $C_3$  e que a disponibilidade de nutrientes é menor, uma vez que parte dela é armazenada em células da bainha do feixe vascular (característica de  $C_4$ ), inacessíveis ou difíceis de digerir. Entretanto, esta hipótese é refutada, pois em nosso estudo não encontramos diferenças entre a quantidade de nutrientes dos dois tipos de folhas. Para os animais, a disponibilidade de nutrientes, neste caso a quantidade de nitrogênio quantificada *a priori* dos experimentos, é similar para ambas as

espécies vegetais. Contudo, a qualidade nutricional das folhas pode ser alterada com o processo de degradação e colonização microbiana (GESSNER et al., 1999).

#### *Hifomicetos aquáticos e o consumo de C<sub>4</sub> por fragmentadores*

As folhas C<sub>4</sub> apresentaram alta taxa de esporulação por hifomicetos aquáticos se comparadas com as folhas C<sub>3</sub>. Neste caso, a maior atividade microbiana nos discos da gramínea favoreceu e estimulou a atividade de fragmentação por *Phylloicus* e *A. longirostri*. A relação positiva entre fragmentadores e hifomicetos aquáticos já foi mostrada em alguns estudos e é relatada como um importante fator para a promoção da palatabilidade do detrito (GULIS & SUBERKROPP, 2003; GULIS et al., 2006). A habilidade dos fungos em digerir compostos estruturais e a adição de nutrientes promovida pela sua colonização são atrativos para os fragmentadores, pois além de tornar as folhas mais facilmente digeridas promovem um acréscimo em sua biomassa (GESSNER et al., 1999). Portanto, há uma relação linear de causa e efeito na qual a colonização microbiana facilita a atividade de alimentação de fragmentadores e promove, assim, a perda de massa foliar. Embora, os fungos, também promovam perda de massa diretamente na liberação de enzimas que quebram polímeros estruturais e convertem a matéria orgânica resultante em CO<sub>2</sub> e biomassa (SUBERKROPP, 1998, GESSNER, 1997; GESSNER et al., 1999). Os hifomicetos também são beneficiados pela baixa concentração de lignina nas folhas C<sub>4</sub>, pois sendo mais lábeis, favorecem o crescimento do micélio e a produção de conídios (FERREIRA & CHAUVET, 2011; FERREIRA et al., 2012; TALBOT & TRESEDER, 2012).

Os *Phylloicus* foram sensíveis ao tempo de condicionamento microbiano, consumindo mais as folhas C<sub>4</sub> de sete dias de atividade microbiana, contrariamente aos eglídeos que não fizeram distinção. A ausência de preferência dos eglídeos em relação ao condicionamento corrobora com a característica generalista deste grupo (BUENO & BOND-BUCKUP, 2004;

SANTOS et al., 2008), apesar de mostrarem preferência específica pelas folhas C<sub>4</sub>. Estes macroconsumidores já se mostraram determinantes para a decomposição foliar (COGO & SANTOS, 2013), com destacada participação nas cadeias tróficas de riachos (COGO et al., 2014; CEREZER et al., 2016). Nossos resultados corroboram aqueles dados, com maiores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados para este grupo, uma vez que ocupam nível mais elevado na cadeia trófica que os *Phylloicus*. Os exemplares de *Phylloicus*, por sua vez, mostraram-se influenciados pela alta atividade dos hifomicetos registrada em sete dias de condicionamento. A colonização microbiana é caracterizada por apresentar picos de atividade, que podem variar de acordo com a espécie vegetal (GULIS, 2001) e com a disponibilidade de nutrientes dissolvidos na água (FERREIRA et al., 2006), mas que geralmente resultam em intensa atividade de fragmentação e perda de massa. Estes resultados sugerem uma resposta sinérgica entre o condicionamento microbiano e a presença de fragmentadores no processamento de material em decomposição (WRIGHT & COVICH 2005a, b).

A comunidade de hifomicetos também mostrou colonizar as folhas C<sub>4</sub> diferentemente das folhas C<sub>3</sub>, conforme hipótese do estudo. Encontramos 9 espécies associadas as folhas em decomposição, e esta lista de espécies é inédita para a região sul do Brasil. A espécie *H. submersus* esteve associada apenas à discos C<sub>3</sub> e *T. marchalianum* apenas à discos C<sub>4</sub>. As espécies *C. aquatica*, *H. submersus* e *L. curvula* foram dominantes (69% do total) em nosso estudo, o que corrobora com achados de riachos tropicais (SCHOENLEIN-CRUSIUS & GRANDI, 2003; PEREIRA, 2015) e temperados (GULIS, 2001; FERREIRA & CHAUVET, 2011; CORNUT et al., 2014; CORNUT et al., 2015). As especificidades registradas na colonização dos fungos mostram que as características do substrato influenciam sua associação (GULIS, 2001). Atributos foliares, como apêndices epidérmicos, pelos, escamas e papilas, aumentam a aspereza da superfície foliar, elevando o sucesso de fixação dos conídios ao substrato (DANG et al., 2007; KEARNS &

BÄRLOCHER, 2008). Por outro lado, cutículas muito espessas representam uma barreira à colonização fúngica (CANHOTO & GRAÇA, 1999). As folhas de *P. urvillei* são pilosas e apresentam tricomas e papilas na epiderme (OLIVEIRA et al., 2013), enquanto as folhas de *N. megapotamica* são glabras ou lisas e podem apresentar tricomas esparsos na parte abaxial (ALVES, 2007; ZANON et al., 2009). Um estudo anterior (BIASI et al. Submetido – Capítulo 1) com folhas de *N. megapotamica* e a associação de fragmentadores sugere que esta espécie pode ser um recurso de uso tardio pelos invertebrados, pois foi utilizada como item alimentar após 14 dias de condicionamento microbiano. GRAÇA et al. (2015b) sugere que folhas com alto grau de defesas, como dureza e lignina, podem atuar como filtro ambiental e selecionar espécies especialistas e retardar o crescimento e reprodução microbiano.

#### *Assimilação de carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> por fragmentadores*

A assinatura do carbono dos animais que passaram pelo experimento de preferência alimentar mostrou um enriquecimento dos tecidos em relação a fonte C<sub>3</sub>, entretanto houve baixa assimilação de carbono C<sub>4</sub> para ambos os fragmentadores (contribuição: *Phylloicus* ~24% e *A. longirostri* ~44%), apesar da alta taxa de consumo da planta *P. urvillei*. Estes resultados sugerem que o fluxo energético em riachos florestados é mantido principalmente por recursos oriundos do carbono C<sub>3</sub>, que passa efetivamente para níveis tróficos superiores e é controlado pelos invertebrados detritívoros (FORSBERG, 1992). Estes resultados são intrigantes e refletem uma seletividade passiva dos animais, pois indicam certa limitação para incorporar este carbono nos tecidos e que, provavelmente, são eliminados pelas fezes (FORSBERG, 1992; CLAPCOTT & BUNN, 2003). Alguns estudos com diferentes espécies de insetos terrestres com dieta de vegetação C<sub>4</sub> registraram queda no fitness desses animais, quando comparados com dieta C<sub>3</sub> e estes resultados foram explicados pela limitação dos animais em digerir os detritos C<sub>4</sub> (PICKFORD, 1962; CASWELL & REED, 1976). A

indigestibilidade deste item alimentar foi sugerida pelos autores devido a análises microscópicas revelarem detritos intactos no trato digestivo dos animais.

Entretanto, outras questões relativas a assimilação de carbono, analisadas por isótopos estáveis, devem ser levadas em consideração, como (i) os animais assimilarem os componentes da dieta com eficiência diferenciada; (ii) os tecidos animais fracionarem os isótopos de sua dieta, (iii) os animais alocarem os nutrientes da dieta diferencialmente para tecidos específicos e (iv) o tempo de reposição do tecido dos animais (*turnover*) (GANNES et al., 1997; MARTINELLI et al., 2009).

### *Considerações finais*

Em resumo, nossos resultados sugerem que plantas  $C_4$  podem ser, preferencialmente, consumidas pelos fragmentadores, embora ocorra baixa assimilação deste carbono nos tecidos dos animais. O maior consumo das folhas  $C_4$  está associado à baixa quantidade de lignina e às altas taxas de atividade microbiana neste detrito, corroborando com nossa segunda hipótese. A baixa contribuição do carbono  $C_4$  para os fragmentadores pode ser explicado pela diferença anatômica dos tecidos de espécies  $C_4$ , que pode ser de difícil degradação. Estes resultados sugerem que a comunidade de hifomicetos e fragmentadores são correlacionadas com a vegetação composta especialmente por arbóreas, que consistem de carbono  $C_3$ . Ensaio de atividade alimentar são importantes, uma vez que revelam padrões que podem ser vistos como um traço adaptativo, pois a seleção dos itens alimentares, frequentemente, promove maior sobrevivência (CANHOTO & GRAÇA, 1995), taxas de crescimento (ARSUFFI & SUBERKROPP, 1988) e reprodução (GRAÇA et al., 1993), o que promove maior fitness dos fragmentadores.

## **Agradecimentos**

Nós agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de C.B. e G.B.C., como também, a bolsa de produtividade para S.S. (proc. #311142/2014-1). L.U.H. recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (proc. #471572/2012-8). Agradecemos também ao professor Dr. Leandro Bugoni da Universidade Federal de Rio Grande pelo auxílio no processamento das amostras para análise de isótopos estáveis.

## **Referências Bibliográficas**

ABELHO, M. From Litterfall to Breakdown in Streams: A Review. **TheScientificWorld** v. 1, p. 656–680, 2001.

ALVES, F. M.; SARTORI, A. L. B. *Nectandra* Rol. ex Rottb. no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n.1, p. 118-129, 2009.

ARDÓN, M.; PRINGLE, C. M. Do secondary compounds inhibit microbial- and insect-mediated leaf breakdown in a tropical rainforest stream, Costa Rica? **Oecologia**, v. 155, p. 311–323, 2008.

ARDÓN, M.; PRINGLE, C. M.; EGGERT, S. L. Does leaf chemistry differentially affect breakdown in tropical vs temperate streams? Importance of standardized analytical techniques to measure leaf chemistry. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 28, p. 440–453, 2009.

ARSUFFI, T. L.; SUBERKROPP, K. Selective feeding by stream caddisfly (Trichoptera) detritivores on leaves with fungal-colonized patches. **Oikos**, v. 45, p. 50–58, 1985.

BELTRÃO, G. B. M.; MEDEIROS, E. S. F.; RAMOS, R. T. C. Effects of riparian vegetation on the structure of the marginal aquatic habitat and the associated fish assemblage in a tropical Brazilian reservoir. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 4, p. 37-43, 2009.

BENFIELD, E. F. Comparison of litterfall input to streams. In: WEBSTER, J. R.; MEYER, J. L. (eds). Stream organic matter budgets. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 16, p. 105-108, 1997.

BIASI, C.; CEREZER, C.; SANTOS, S. Biological colonization and leaf decomposition in a subtropical stream. **Ecología Austral**, v. 26, p.189-199, 2016.

BIASI, C.; TONIN, A. M.; RESTELLO, R. M.; HEPP, L. U. Colonisation of leaf litter by Chironomidae (Diptera): influence of chemical quality and exposure duration in a Neotropical stream. **Limnologia**, v. 43, p. 427–433, 2013.

BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G.; PEREZ-LOSADA, M.; BUCKUP, L.; CRANDALL, K. A. Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 267–273, 2008.

BOYERO, L.; RINCÓN, P. A.; BOSCH, J. Case selection by a limnephilid caddisfly [*Potamophylax latipennis* (Curtis)] in response to different predators. **Behavior Ecology and Sociobiology**, v. 59, p. 364-372, 2006.



BUENO, A. A. P.; BOND-BUCKUP, G. Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup (Crustacea, Decapoda, Anomura) from Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 2, p. 115-127, 2004.

BURRESS, E. D.; GANGLOFF, M. M.; SIEFFERMAN, L. Trophic analysis of two subtropical South American freshwater crabs using stable isotope ratios. **Hydrobiologia**, v. 702, 5–13, 2013.

CANHOTO, C.; GRAÇA, M. A. S. Food value of introduced eucalypt leaves for a Mediterranean stream detritivore: *Tipula lateralis*. **Freshwater Biology** v. 34, p. 209–214, 1995.

CANHOTO, C.; GRAÇA, M. A. S. Leaf barriers to fungal colonization and shredders (*Tipula lateralis*) consumption of decomposing *Eucalyptus globulus*. **Microbial Ecology** v. 37, p. 163–172, 1999.

CANHOTO, C.; GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER F. **Feeding Preferences**. In: GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. Methods to study litter decomposition, p. 297–302, 2005.

CARVALHO, E. M.; GRAÇA, M. A. S. A laboratory study on feeding plasticity of the shredder *Sericostoma vittatum* Rambur (Sericoatomidae). **Hydrobiologia**, v. 575, p. 353–359.

CASATTI, L.; FERREIRA, C. P.; CARVALHO, F. R. Grass-dominated stream sites exhibit low fish species diversity and dominance by guppies: an assessment of two tropical pasture river basins. **Hydrobiologia**, v. 632, p. 273-283.

CASOTTI, C. G.; KIFFER, W. P. JR.; MORETTI, M. S. Leaf traits induce the feeding preference of a shredder of the genus *Triplectides kolenati*, 1859 (Trichoptera) in an Atlantic Forest stream, Brazil: a test with native and exotic leaves. **Aquatic Insects**, v. 36, p. 43–52, 2015.

CASWELL, H.; REED, F. C. Plant-Herbivore Interactions. Indigestibility of C<sub>4</sub> Bundle Sheath Cells by the Grasshopper, *Melanoplus confusus*. **Oecologia**, v. 26, n. 2, p. 151-156, 1976.

CASWELL, H.; REED, F.; STEPHENSON, S. N.; WERNER, P. Photosynthetic pathways and selective herbivory: a hypothesis. **The American Naturalist**, v. 107, n. 956, p. 465-80, 1973.

CEREZER, C.; BIASI, C.; COGO, G. B.; SANTOS, S. Avoid predation or take risks in basic activities? Predator-prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. **Marine and Freshwater Research**, v. 67, n. 12, p. 1880-1887, 2016.

CHESHIRE, K.; BOYERO, L.; PEARSON, R. G. Food webs in tropical Australian streams: shredders are not scarce. **Freshwater Biology**, v. 50, p. 748–769, 2005.

CLAPCOTT, J. E.; BUNN, S. E. Can C<sub>4</sub> plants contribute to aquatic food webs of subtropical streams? **Freshwater Biology**, v. 48, p. 1105–1116, 2003.

COGO, G. B.; BIASI, C.; SANTOS, S. The effect of the macroconsumer *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda) on the invertebrate community in a subtropical stream. **Acta Limnologica Brasiliensia** v. 26, p. 143–153, 2014.

COGO, G. B.; SANTOS, S. The role of aeglids in shredding organic matter in neotropical streams. **Journal of Crustacean Biology**, v. 34, n. 4, p. 519-526, 2013.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Influence of taxonomic resolution of stream macroinvertebrate communities on the evaluation of different land uses. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 4, p. 469-475, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 769-779, 2008.

CORNUT, J.; CHAUVET, E.; MERMILLOD-BLONDIN, F.; ASSEMAT, F.; ELGERA, A. Aquatic Hyphomycete Species Are Screened by the Hyporheic Zone of Woodland Streams. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1949–1960, 2014.

CORNUT, J.; FERREIRA, V.; GONÇALVES, A. L.; CHAUVET, E.; CANHOTO, C. Fungal alteration of the elemental composition of leaf litter affects shredder feeding activity. **Freshwater Biology**, v. 60, n. 9, p. 1755–1771, 2015.

CUMMINS, K. W.; KLUG, M. J. Feeding ecology of stream invertebrates. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 10, p. 147–172, 1979.

DALOSTO, M.; SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, v. 160, p. 461–466, 2011.

DANG, C. K.; GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. Influence of spore traits and leaf structure on attachment success of aquatic hyphomycetes on leaf litter. **Mycologia**, v. 99, p. 24–32, 2007.

FERREIRA, V.; CASTELA, J.; ROSA, P.; TONIN, A.M.; BOYERO, L.; GRAÇA, M.A.S. Aquatic hyphomycetes, benthic macroinvertebrates and leaf litter decomposition in streams naturally differing in riparian vegetation. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 4, p. 711–725, 2016.

FERREIRA, V.; CHAUVET, E. Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. **Global Change Biology**, v. 17, n. 1, p. 551–564, 2011.

FERREIRA, V.; ENCALADA, A. C.; GRAÇA, M. A. Effects of litter diversity on decomposition and biological colonization of submerged litter in temperate and tropical streams. **Freshwater Science**, v. 31, p. 945–962, 2012.

FERREIRA, V.; GULIS, V.; GRAÇA, M. A. S. Whole stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. *Oecologia*, v. 149, p. 718–729, 2006.

FLINDT, M. R.; LILLEBO, A. I. **Determination of Total Nitrogen and Phosphorus in Leaf Litter**. In: GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. *Methods to Study Litter Decomposition. Methods to Study Litter Decomposition. A Practical Guide*, p.329, 2005.

FORSBERG, B. R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; BONASSI, J. A. Autotrophic carbon sources for fish of the central Amazon. **Ecology**, v. 74, p. 643–651, 1993.

GANNES, L. Z.; O'BRIEN, D. M.; DEL RIO, C. M. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. **Ecology**, v. 78, p. 1271–1276, 1997.

GESSNER, M. O. Fungal biomass, production and sporulation associated with particulate organic matter in streams. **Limnetica**, v. 13, p. 33-44, 1997.

GESSNER, M. O. **Ergosterol as a measure of fungal biomass**. In: GRAÇA M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. (eds). *Methods to Study Litter Decomposition. Methods to Study Litter Decomposition. A Practical Guide*, 329 p., 2005.

GESSNER, M. O.; CHAUVET, E.; DOBSON, M. A perspective on leaf litter breakdown in stream. **Oikos**, v. 85, p. 377-384, 1999.

GONÇALVES JR. J. F.; CALLISTO, M. Organic-matter dynamics in the riparian zone of a tropical headwater stream in Southern Brasil. **Aquatic Botany**, v. 109, p. 8– 13, 2013.

GRAÇA, M. A. S. The role of invertebrates on leaf decomposition in streams: a review.

**International Review of Hydrobiology**, v. 86, p. 383–393, 2001.

GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. **Methods to study litter decomposition. A practical guide**. Springer, The Netherlands, Dordrecht, 329 p., 2005.

GRAÇA, M. A.; CRESSA, C. Leaf quality of some tropical and temperate tree species as food resource for stream shredders. **International Review of Hydrobiology**, v. 95, p. 27–41, 2012.

GRAÇA, M. A. S.; CRESSA, C.; GESSNER, M. O.; FEIO, M. J.; CALLIES, K. A.; BARRIOS, C. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**, v. 46, p. 947–957, 2001.

GRAÇA, M. A. S.; FERREIRA, V.; CANHOTO, C.; ENCALADA, A. C.; GUERRERO-BOLANO, F.; WANTZEN, K. M.; BOYERO, L. A conceptual model of litter breakdown in low order streams. **International Review of Hydrobiology**, v. 100, p. 1-12, 2015a.

GRAÇA, M. A. S.; HYDE, K.; CHAUVET, E. Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical e subtropical low order streams. **Fungal Ecology**, 2015b.

GRAÇA, M. A.; POQUET, J. M. Do climate and soil influence phenotypic variability in leaf litter, microbial decomposition and shredder consumption? **Oecologia**, v. 174, p. 1021–32, 2014.

GULIS, V. Are there any substrate preferences in aquatic hyphomycetes? **Mycological Research**, v. 105, n. 9, p. 1088-1093, 2001.

GULIS, V.; FERREIRA, V.; GRAÇA, M. A. S. Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. **Freshwater Biology**, v. 51, p. 1655–1669, 2006.

GULIS, V.; SUBERKROPP, K. Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 123–134, 2003.

KEARNS, S. G.; BÄRLOCHER, F. Leaf surface roughness influences colonization success of aquatic hyphomycete spore. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 13–18, 2008.

KÖNIG, R.; HEPP, L.U.; SANTOS, S. Colonisation of low- and high-quality detritus by benthic macroinvertebrates during leaf breakdown in a subtropical stream. **Limnologica**, v. 45, p. 61–68, 2014.

LEBERFINGER, K.; BOHMAN, I.; HERRMANN, J. The importance of terrestrial resource subsidies for shredders in open-canopy streams revealed by stable isotope analysis. **Freshwater Biology**, v. 56, p. 470-480. 2011.

LEITE-ROSSI, L. A.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Are sugar cane leaf-detritus well colonized by aquatic macroinvertebrates? **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, p. 303-313, 2012.

LIMA, L.S.; GONÇALVES, JR. J. F. Heterogeneidade temporal e espacial na composição química do detrito foliar. In Livro de resumos do II Simpósio Processos Ecológicos, Restauração e Ecoavaliação em Zonas Ripárias (AquaRipária). Brasília: AquaRipária, p. 12-15, 2015.

LISBOA, L.; SILVA, A. L. L.; SEIGLOSH, A. A.; GONÇALVES, J. F. JR.; PETRUCIO, M. M. Temporal dynamics of allochthonous coarse particulate organic matter in a subtropical Atlantic Rainforest Brazilian stream. **Marine and Freshwater Research**, v. 66, p. 1-7, 2015.

MARTINELLI, L. M.; BALLESTER, M. V.; KRUSCHE, A.V.; VICTORIA, R. L.; DE CAMARGO, P. B.; BERNARDES, M.; OMETTO, J. P. H. B. Landcover changes and  $\delta^{13}C$  composition of riverine particulate organic matter in the Piracicaba River Basin (southeast region of Brazil). **Limnology and Oceanography** v. 44, n. 7, p. 1999, 1826–1833, 1999.

MARTINELLI, L.A.; OMETTO, J.P.H.B.; FERRAZ, E.S.; VICTORIA, R.L.; De Camargo, P.B.; Moreira, M.Z. **Desvendando questões ambientais com Isótopos Estáveis**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

MORETTI, M.S.; LOYOLA, R.D.; BECKER, B.; CALLISTO, M. Leaf abundance and phenolic concentrations codetermine the selection of case-building materials by *Phylloicus* sp. (Trichoptera, Calamoceratidae). **Hydrobiologia**, v. 630, p. 199–206, 2009.

NOLEN, J. A.; PEARSON, R. G. Life History Studies of *Anisocentropus kirramus* Neboiss (Trichoptera: Calamoceratidae) in a Tropical Australian Rainforest Stream. **Aquatic Insects**, v. 14, p. 213-221, 1992.

NOLEN, J. A.; PEARSON, R. G. Factors affecting litter processing by *Anisocentropus kirranus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from an Australian tropical rainforest stream. **Freshwater Biology** v. 29, p. 469–479, 1993.



OLIVEIRA, R. C.; SANTANA, S. L.; SILVA, A. S.; MACIEL, J. R.; VALLS, J. F. M. Paspalum (Poaceae) in Rio Grande do Norte, Brazil. **Rodriguésia**, v. 64, n.4, p. 847-862, 2013.

PEREIRA, P.G. Influência da química do detrito foliar e da água sobre a comunidade de hifomicetos aquáticos. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2015.

PETERSON, B.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** v. 18, p. 293-320, 1987.

PETTIT, N. E.; DAVIES, T.; J. B. FELLMAN, P. F. GRIERSON, D. M. WARFE; P. M. DAVIES. Leaf litter chemistry, decomposition and assimilation by macroinvertebrates in two tropical streams. **Hydrobiologia**, v. 680, p. 63–77, 2012.

PICKFORD, R. Development, survival and reproduction of *Melanoplus bilituratus* reared on various food plants. *The Canadian Entomologist*, v. 94, p. 859-869, 1962.

PRAMUAL, P.; KUVANGKADILOK, C. Agricultural land use and black fly (Diptera, Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. **Hydrobiologia**, v. 625, p. 173-184, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available from: <<http://www.R-project.org>>.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. *Biologia Vegetal* - 8ª Edição. Guanabara Koogan, 876p. 2014.

REZENDE, R. S.; LEITE, G. F. M.; DE-LIMA, A. K.; SILVA-FILHO, L. A. B.; CHAVES, C. V. C.; PRETTE, A. C. H.; FREITAS, J. S.; GONÇALVES, J. F. JR. Effects of density and predation risk on leaf litter processing by *Phylloicus* sp. **Austral Ecology**, v. 40, n. 6, p. 693–700, 2015.

RINCÓN, J; MARTÍNEZ, I. Food quality and feeding preferences of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) **Journal of North American Benthological Society**, v. 25, p. 209-215, 2006.

SANTOS, S.; AYRES-PERES, L.; CARDOSO, R. C. F.; SOKOLOWICZ, C. C. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**, v. 42, n. 13-14, p. 1027-1037, 2008.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; RODRIGUES, G. L.; BORDIGNON, M. V. Caracterização morfofisiológica e anatômica de *Paspalum urvillei* (Steudel). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1674-1679, 2002.

SCHIERS J.; BRUYN L. D.; VERHAGEN, R. A test of the C3-C4 hypothesis with two grass miners. **Ecology**, v. 82, p. 410–421, 2001.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; GRANDI, R. A. P. The Diversity of Aquatic Hyphomycetes in South America. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p.183-193, 2003.

SCHWARZE, P. Phenole und chinone und die Bildung von Benzolkernen bei höheren Pflanzen. **Encyclopedia of Plant Physiology**, v. 10, p. 507–542, 1958.

SHIEH, S. H.; WANG, C. P.; HSU, C. P.; YANG, P. S. Leaf breakdown in a subtropical stream: nutrient release patterns. **Fundamental and Applied Limnology Archiv für Hydrobiologie**, v. 171, n. 4, p. 273–284, 2008.

SUBERKROPP, K. Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter. **Mycological Research**, v. 102, p. 998–1002, 1998.

TALBOT, J.M., TRESEDER, K.K., 2012. Interactions among lignin, cellulose, and nitrogen drive litter chemistry–decay relationships. *Ecology* 93, 345-354.

TONELLO, G.; NAZILOSKI, L. A.; TONIN, A.; RESTELLO, R. M.; HEPP, L. U. Effect of *Phylloicus* on leaf breakdown in a subtropical stream. **Limnetica**, v. 35, p. 243–252, 2016.

TONIN, A. M.; HEPP, L. U.; RESTELLO, R. M.; GONÇALVES, J. F. Understanding of colonization and breakdown of leaves by invertebrates in a tropical stream is enhanced by using biomass as well as count data. **Hydrobiologia**, v. 740, n. 1, p. 79-88, 2014.

TUFFI, S. L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A.; TIBURCIO, R. A. S. MACHADO, A. F. L. Leaf Anatomy and Morphometry in three Eucalypt Clones Treated with Glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 129-136, 2009.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 46, p. 829–835, 1993.

VANNOTE, R. L.; MINSHALL, G. W.; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J. R.; CUSHING, C. E. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.37, p.130-137, 1980.

WALLACE, J. B.; EGGERT, S. L.; MEYER, J. L.; WEBSTER, J. R. Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. **Science**, v. 277, p. 102–104, 1997.

WRIGHT, M. S.; COVICH, A. P. The effect of macroinvertebrate exclusion on leaf breakdown rates in a tropical headwater stream. **Biotropica**, v. 37, p. 403–408, 2005a.

WRIGHT, M. S.; COVICH, A. P. Relative importance of bacteria and fungi in a tropical headwater stream: leaf decomposition and invertebrate feeding preference. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 536–546, 2005b.

ZANON, M. M. F.; GOLDENBERG, R.; MORAES, P. L. R. O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 22–35, 2009.

ZHANG, Y.; DUDGEON, D.; CHENG, D.; THOE, W.; FOK, L.; WANG, Z.; LEE, J. H. W. Impacts of land use and water quality on macroinvertebrate communities in the Pearl River drainage basin, China. **Hydrobiologia**, v. 652, n. 1, p. 71-88, 2010

### CAPÍTULO 3

#### NUTRIENT ENRICHMENT IN WATER MORE THAN IN LEAVES AFFECT AQUATIC MICROBIAL LITTER DECOMPOSITION



PLANTAS DE *QUERCUS ROBUR* CRESCENDO SOB CONDIÇÃO DE FERTILIZAÇÃO E NÃO-FERTILIZAÇÃO.

Artigo formatado Segundo as normas da Revista “Oecologia” (ISSN: 1432-1939), fator de impacto 2,902, Qualis CAPES Estrato A1 – On line first (doi: 10.1007/s00442-017-3869-5)

Cristiane Biasi<sup>1\*</sup>, Manuel A.S. Graça<sup>2</sup>, Sandro Santos<sup>1</sup>, Verónica Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Animal Biodiversity, Ecology and Evolution Department, Center of Natural and Exact Sciences, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima, 1000, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Largo Marquês de Pombal, 3004-517 Coimbra, Portugal

\*Corresponding author: C. Biasi; Tel.: +55 (55) 3220-8465 extension 20; E-mail: cristiane.biasi@gmail.com

**Abstract** Nutrient enrichment of soils and water will intensify in the future and has the potential to alter fundamental ecosystem processes, such as litter decomposition. We tested the direct (via water nutrient enrichment) and indirect (via changes in leaf chemistry) effects of nutrient enrichment on microbial activity and decomposability of *Quercus robur* L. (oak) leaves in laboratory microcosms simulating streams. Senescent leaves of oak trees grown without and with fertilization were incubated under ambient and elevated water nutrient (nitrogen (N) and phosphorus (P)) concentrations for 60 days. Soil fertilization led to an increase in leaf (3.4×) and leaf litter (2.3×) N concentration. Increased water dissolved nutrients concentration stimulated microbial activity (N uptake, microbial respiration, fungal biomass buildup and conidia production by aquatic hyphomycetes) that translated into accelerated litter decomposition (2.1× for unfertilized and 1.6× for fertilized trees). Leaves from fertilized trees had higher microbial activity and decomposition rates than leaves from unfertilized trees only at low dissolved nutrient availability. When both litter and water nutrients concentration increased, microbial activity and leaf decomposition were stimulated, but the effects were additive and direct effects from increased dissolved nutrient availability were stronger than those mediated by increases in litter N concentration (indirect effects). Our results suggest that increases in water nutrient availability (within the range used in this study) may exert a stronger control on microbial activity and litter decomposition than litter nutrient enrichment.

**Key-words:** Eutrophication. Fertilization. Litter. Aquatic Hyphomycetes. Decomposition. Streams

**Introduction**

Human activity has become the primary driver of global environmental change (Rockström et al. 2009). One of the most pervasive human impacts on both terrestrial and aquatic systems is the increase in nutrient availability (Rockström et al. 2009), caused mainly by the use of fertilizers (Bowman et al. 2008; Galloway et al. 2008). Additionally, atmospheric nitrogen (N) deposition is a significant contributor to ecosystems nutrient enrichment, particularly in western Europe, eastern USA and China (Holland et al. 2005; Zhang et al. 2012; Liu et al. 2013; Meunier et al. 2016). As agriculture intensifies to feed a growing human population (Galloway and Cowling 2002) and atmospheric N deposition rises due to increases in the combustion of fossil fuels and intensification in agriculture and cattle production (Liu et al. 2013), nutrient enrichment of soils and water will also intensify in the future (MEA 2005). Increased nutrient availability has the potential to alter fundamental ecosystem processes and thus affect ecosystem services (Woodward et al. 2012).

Plant litter decomposition is an essential ecosystem process in small forest streams, where shade by the riparian vegetation limits instream primary production and terrestrially derived leaf litter constitutes a primary source of carbon and energy for aquatic food webs (Vannote et al. 1980; Wallace et al. 1997). The decomposition of this leaf litter is largely mediated by aquatic microbes, especially aquatic hyphomycetes (Hieber and Gessner 2002; Gulis and Suberkropp 2003a; Pascoal and Cássio 2004). Microbes macerate the litter by the activity of their external enzymes, mineralize organic carbon through respiration, convert it into mycelium and reproductive structures (conidia) and promote the release of fine particulate organic matter, which leads to leaf litter mass loss (Hieber and Gessner 2002; Gulis and Suberkropp 2003a, b; Cornut et al. 2010).

Microbial decomposers can use nutrients from both the organic substrate and the water, but dissolved nutrients are already in their inorganic form and are easier to uptake (Suberkropp and Chauvet 1995; Suberkropp 1998; Gulis and Suberkropp 2003a, b). Increases in nutrient availability resulting from human activity can thus affect microbial activity and litter decomposition directly by increasing inorganic nutrients concentration in water. Indeed, stream nutrient enrichment stimulates



microbial metabolism, growth and reproduction (Suberkropp and Chauvet 1995; Gulis and Suberkropp 2003b; Gulis et al. 2004, 2006; Ferreira et al. 2006) and consequently litter decomposition (Ferreira et al. 2015).

Human-induced increases in nutrient availability can also affect microbes and litter decomposition indirectly by changing leaf litter properties, including leaf nutrient concentration since leaf traits are related to local environmental conditions including soil nutrient availability (Reich and Oleksyn 2004). Plants from nutrient-rich soils tend to have higher leaf N and phosphorus (P) concentration and lower lignin concentration and specific leaf area than plants from nutrient-poor soils (Lecerf and Chauvet 2008; Liu et al. 2010; Graça and Poquet 2014). Traits such as toughness, lignin and nutrients concentration (mainly N and P) and plant chemical defenses are predictors of leaf litter decomposition rates. Soft litter, with high nutrient concentrations and low lignin concentration, generally support higher microbial activity and decompose faster than more recalcitrant litter (Gessner and Chauvet 1994; Lecerf and Chauvet 2008; Graça and Cressa 2010; Ferreira et al. 2012). This trend is also found within given species as a result of high intraspecific variability in leaf traits (LeRoy et al. 2007; Lecerf and Chauvet 2008; Graça and Poquet 2014). Several studies have addressed the simultaneous effects of water nutrient enrichment and changes in leaf characteristics on microbial litter decomposition by using different leaf species. These studies generally show a stronger stimulation of microbial activity and litter decomposition with water nutrient enrichment for litter with low than high nutrient concentration due to a stronger nutrient limitation of microbes in the nutrient-poor substrates (Gulis and Suberkropp 2003a, b; Ferreira et al. 2006; Gulis et al. 2006; Ardón et al. 2009; but see Fernandes et al. 2014). Changes in dissolved nutrient availability and in litter quality also generally affect aquatic hyphomycete community structure since different species have different enzymatic capabilities and nutrient requirements (Chandrashekar and Kaveriappa 1988; Bisht 2013; Grimmer et al. 2013; Danger et al. 2016). However, no previous study investigated how litter decomposition is simultaneously affected by water nutrient enrichment and litter nutrient enrichment.

Here we tested the direct (via water nutrient enrichment) and indirect (via changes in leaf chemistry caused by fertilization) effects of nutrient enrichment on microbial activity (overall microbial metabolism, fungal somatic growth and aquatic hyphomycete reproduction) and leaf decomposition in laboratory microcosms simulating streams. Senescent leaves of *Quercus robur* L. (oak) trees grown without and with fertilization, and thus different in chemical composition, were incubated under ambient and elevated water nutrients concentration. Since the nutrient concentration in the soil potentially influences the chemical composition of the leaves, we expected that increases in soil fertilization would lead to the production of leaves with higher nutrient concentration and lower concentrations of structural and secondary compounds when compared with leaves from trees in unfertilized soils (Lecerf and Chauvet 2008; Liu et al. 2010; Graça and Poquet 2014). We expected that less recalcitrant leaves (e.g. higher nutrient concentration, lower concentration of structural compounds) would support higher microbial activity and decompose faster than more recalcitrant leaves (Gessner and Chauvet 1994; Lecerf and Chauvet 2008; Ferreira et al. 2012). Nutrient enrichment of stream waters generally stimulates microbial activity and litter decomposition, and thus we expected that increases in water nutrients concentration would promote microbial activity and litter decomposition (Suberkropp and Chauvet 1995; Gulis and Suberkropp 2003a, b; Ferreira et al. 2006, 2015). The relative importance of the direct and indirect effects of nutrient enrichment on microbial activity and litter decomposition is harder to anticipate, but we expected a synergistic interaction since individual increases in nutrient concentration in leaves and in water generally stimulate microbial activity, i.e. affect microbial activity in the same direction. Changes in leaf chemical composition and water nutrient availability were also predicted to affect aquatic hyphomycete community structure (Gulis and Suberkropp 2003a, b; Ferreira et al. 2006).

## **Materials and Methods**

### *Trees and leaf litter*

To test the degree to which leaf litter traits responded to fertilization, ten *Q. robur* trees of 1.7 – 2.0 meters height (about 2 years old) were planted individually in 40-L buckets containing 50 % sand and 50 % ground pine bark as a substrate. Trees were kept in the open air in a garden from April to November 2015, at Semide, central Portugal (mean annual air temperature and precipitation: 15.5 °C and 999 mm, respectively). Trees were randomly allocated into two treatments, without (NoFert) and with (Fert) fertilization (n = 5 for each treatment). At monthly intervals (May to October 2015), ~ 17.7 g of fertilizer (Compo Blaukorn®, Münster, Germany) were added to the five trees in the Fert treatment; this corresponds to monthly additions of 2.625 g of N, 0.458 g P, 1.743 g K, 0.210 g Mg, 1.575 g Na, 3.5 mg B and 1.8 mg Zn. Trees were daily watered (~ 1 L). In fall 2015 (October – November), senescent leaves were collected individually (per tree), air dried at room temperature and stored in paper bags in the dark until used.

#### *Leaf litter conditioning*

Leaf discs (12-mm Ø) were cut with a cork borer from moistened leaves, avoiding primary and secondary veins, oven-dried (40 °C, 48 h) and weighed in groups of 20 discs ( $\pm$  0.01 mg). Each group of discs was enclosed into 500 µm mesh bags (5 × 7 cm) and bags were incubated in a 20-L tank containing unfiltered stream water and ~ 8 L of a diverse litter mixture composed of leaves at different stages of degradation for microbial colonization. Both water and litter were collected from a local oligotrophic stream (Ribeira do Candal, Lousã Mountain, central Portugal; 40°4'44'N, 8°12'19''W, 620 m asl), flowing through a broadleaf deciduous forest dominated by chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and oak trees (see Ferreira et al. (2012) for environmental details). The water in the tank was renewed every two days to prevent the accumulation of polyphenols leached from the litter, which could inhibit microbial colonization of leaf discs. The tank was kept at 18 °C, under 12 h light:12 h dark regime and with strong aeration for one week to ensure inoculation of leaf discs by near-natural microbial decomposer assemblages.

After one week conditioning, each group of discs was used in a microcosm experiment (see below). Discs dry mass (DM) at day 0 was estimated by multiplying DM before conditioning by a conversion factor derived from an additional group of discs from each tree that was conditioned for one week. These discs were dried at 40 °C for 48 h and weighed ( $\pm 0.01$  mg) for determination of DM after conditioning, and the before-to-after DM conversion factor was calculated as the ratio between DM after conditioning to DM before conditioning.

#### *Leaf chemical and physical properties*

Leaf toughness was determined for ten discs from each tree with a penetrometer after discs had been soaked in distilled water for 1 h, with results expressed as the mass (g) required to force a blunt iron rod (1.55 mm  $\varnothing$ ) through the disc (Graça et al. 2005). Specific leaf area (SLA) was determined for the same leaf discs after drying at 40 °C for 48 h and expressed as  $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$ . Green leaves (collected from trees by the end of September), senescent leaves and leaf discs (before and after conditioning) were ground to powder (1 mm screen; Retsch MM 400, Haan, Germany) and analyzed for carbon (C) and N concentration (IRMS Thermo Delta V advantage with a Flash EA - 1112 series; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA;  $n = 3$  per tree). Lignin (Goering and Van Soest 1970), total polyphenols (Graça et al. 2005) and P concentrations (APHA 1998) were also determined for senescent leaves ( $n = 3$  per tree). Results of chemical analyses were expressed as percentage of dry mass (% DM).

#### *Microcosms*

Laboratory microcosms consisted of 100-mL Erlenmeyer flasks supplied with 40 mL of either a low (LowNP,  $n = 30$ ) or a high (HighNP,  $n = 30$ ) nutrient solution, renewed three times a week. The LowNP solution contained per liter of distilled water 0.055 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mg  $\text{KNO}_3$ , 75.5 mg  $\text{CaCl}_2$ , 10 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.5 g morpholino-propane sulfonic acid (corresponding to  $0.01 \text{ mg P L}^{-1}$  and  $0.14 \text{ mg N L}^{-1}$ , which is within the values found in oligotrophic streams in

central Portugal; Gulis et al. 2006), while the HighNP solution was amended with 5.5 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $\text{L}^{-1}$  and 100 mg  $\text{KNO}_3$   $\text{L}^{-1}$  (corresponding to 0.98 mg P  $\text{L}^{-1}$  and 13.9 mg N  $\text{L}^{-1}$ ) (adapted from Dang et al. (2005)). Microcosms were displayed on an orbital shaker (100 – 117 rotations  $\text{min}^{-1}$ ; GLF 3017, Burgwedel, Germany) at 18 °C and under a 12 h light:12 h dark regime.

Half of the microcosms in each nutrient level ( $n = 15$ ) received a group of conditioned leaf discs (see above) from either NoFert or Fert trees so that there were four treatments in a complete factorial design: (i) leaves from unfertilized trees incubated in low nutrient solution — NoFert, LowNP, (ii) leaves from unfertilized trees incubated in high nutrient solution — NoFert, HighNP, (iii) leaves from fertilized trees incubated in low nutrient solution — Fert, LowNP and (iv) leaves from fertilized trees incubated in high nutrient solution — Fert, HighNP ( $n = 15$  for each; Online resource 1).

After 15, 35 and 60 days incubation, five microcosms per treatment (i.e. one per tree) were sampled for the determination of leaf mass, leaf N and C concentrations, leaf toughness, microbial respiration rate, fungal biomass and conidia production by aquatic hyphomycetes (see below).

#### *Conidia production by aquatic hyphomycetes*

When microcosms were sampled, the conidial suspensions were saved into 50-mL Falcon tubes, preserved with 2 mL of 37 % formalin and stored in the dark until processed. Before conidial counting and identification, 150  $\mu\text{L}$  of polyethylene glycol p-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-phenyl ether (Triton X-100, 0.5 %) were added to the suspensions and mixed with a magnetic stirring bar to ensure a uniform distribution of conidia, and an aliquot of the suspension was filtered through cellulose nitrate filters (25 mm  $\varnothing$ , 5  $\mu\text{m}$  pore size; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany). Filters were stained with 0.05 % trypan blue in 60 % lactic acid, and spores were identified and counted under a microscope at 200 $\times$  magnification (Wild, Heerbrugg, Switzerland) according to Graça et al. (2005). To standardize the species richness by sample size were counted ~ 200 conidia per sample. Sporulation rates, a measure of reproductive activity, were expressed as no.

conidia released  $\text{mg}^{-1}$  leaf DM  $\text{day}^{-1}$  and aquatic hyphomycete species richness as no. species  $\text{sample}^{-1}$ .

### *Microbial respiration rate*

Five discs were removed from each sampled microcosm to determine overall microbial metabolism as microbial oxygen consumption rates using a closed six-channel dissolved oxygen measuring system (Strathkelvin 929 System, North Lanarkshire, UK). The oxygen electrodes were calibrated against a saturated solution of sodium sulphite in 0.01 M sodium borate (0 %  $\text{O}_2$ ) and a 100 %  $\text{O}_2$ -saturated low or high nutrient solution at 18 °C. Leaf discs were incubated in 3-mL chambers filled with the corresponding 100 %  $\text{O}_2$ -saturated nutrient solution kept at 18 °C by a water bath. Additional chambers without leaf discs were used as controls. After a ~ 20 – 60 min trial, leaf discs were saved, oven dried (40 °C, 48 h) and weighed ( $\pm 0.01$  mg) for determination of DM. Oxygen consumption rates were determined by the difference in the  $\text{O}_2$  concentration in the sample and the control over a 15 min interval during which  $\text{O}_2$  consumption over time was linear (between 5 – 20 min incubation). Results were expressed as  $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1}$  leaf DM  $\text{h}^{-1}$ .

### *Fungal biomass*

Five additional leaf discs from each microcosm were frozen at – 20 °C, lyophilized overnight, weighed ( $\pm 0.01$  mg) to determine DM and used for ergosterol extraction as a surrogate for mycelial biomass (Gessner and Chauvet 1993; Graça et al. 2005). Lipid extraction and saponification were carried out in 10 mL KOH/methanol ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ) at 80 °C for 30 min. The extract was purified by solid phase extraction (Waters Sep-Pak © Vac RC tC18 cartridges; Waters Corp., Milford, MA, USA) and quantified with high-performance liquid chromatography (HPLC; Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA) by measuring absorbance at 282 nm. The HPLC system was equipped with the Thermo Scientific Synchronis C18 column ( $250 \times 4$  mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size; Thermo, Waltham, MA, USA) and the Thermo Universal Unigard holder 4/4.6 mm ID3 +

Synchronis C18 (10 × 4 mm, 5 µm particle size) drop in guard pre-column (Thermo), maintained at 33 °C. The mobile phase was 100 % methanol and the flow rate was set to 1.4 mL min<sup>-1</sup>. Fungal biomass was estimated from ergosterol assuming 5.5 µg ergosterol mg<sup>-1</sup> fungal DM and the results were expressed as mg fungal DM g<sup>-1</sup> leaf DM.

#### *Leaf litter toughness, decomposition and nutrient concentration*

The remaining ten leaf discs from each microcosm were used for toughness determinations, as a surrogate for enzymatic maceration of leaf litter, as described above. Leaf toughness was expressed as percentage of loss relative to initial (d0) values. Further, these discs were dried at 40 °C for 48 h and weighed (± 0.01 mg) for determination of DM. The DM of all three sets of discs from each microcosm was added up for determination of percentage of DM remaining. The ten leaf discs used only for DM determination were ground to powder and analyzed for C and N concentration, as described above. Nitrogen concentration and C:N ratio were expressed as percentage of change relative to initial (d0) values.

#### *Data analysis*

Leaf toughness, SLA, polyphenols, lignin, C, N and P concentrations and C:N ratio were compared between fertilization levels (NoFert vs. Fert) for senescent leaves by *t*-tests. Nitrogen and C concentration and the C:N ratio were compared between fertilization levels (NoFert vs. Fert) and between (i) green and senescent leaves to assess changes in nutrient concentrations due to nutrient reabsorption during senescence, (ii) senescent leaves and leaf discs before conditioning to assess if leaf discs quality would be representative of leaf quality and (iii) leaf discs before and after conditioning to assess changes in nutrient concentration due to leaching and microbial conditioning, by two-way analysis of variance (ANOVA; fertilization and leaf state as categorical factors).

Leaf decomposition (ln-transformed fraction of DM remaining) was compared among treatments by analysis of covariance (ANCOVA; fertilization and water nutrients as categorical

factors, time as covariate) followed by Fisher's test for multiple comparisons. Exponential decomposition rates on a per day basis ( $k$ ,  $\text{day}^{-1}$ ) were estimated for each treatment by linear regression of ln-transformed proportion of DM remaining over time (negative exponential model with fixed intercept). The observed (obs) and expected (exp) decomposition rates in a future scenario of nutrient enrichment (Fert, HighNP) were compared to assess the type of interaction between fertilization and water nutrients:  $\text{obs} \sim \text{exp}$  indicates additive effects,  $\text{obs} > \text{exp}$  indicates synergistic effects and  $\text{obs} < \text{exp}$  indicates antagonistic effects. The expected decomposition rate in a Fert, HighNP scenario was estimated from the stimulation of leaf decomposition observed in a present non-impacted scenario (NoFert, LowNP) by fertilization alone (Fert, LowNP) plus the stimulation by increases in water nutrients alone (NoFert, HighNP), assuming no interaction between factors.

Percentage of change in N concentration ( $\log(x+66.2)$ ), C:N ratio ( $\log(x+76.8)$ ; constants added to get only positive values) and toughness ( $\text{acosin}$ ), microbial respiration rate ( $\log(x+1)$ ), fungal biomass, sporulation rate ( $\sqrt{\log(x+1)}$ ) and species richness of aquatic hyphomycetes were compared among treatments by for two-way repeated-measures ANOVAs (fertilization and water nutrients as categorical factors) followed by Tukey's test, or Fisher's test when Tukey's test was not able to identify differences for significant factors in ANOVA. Ordination of aquatic hyphomycete communities was done by non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis similarity matrix of conidial production data ( $\log(x+1)$ ). Analysis of similarity (ANOSIM) was used to compare aquatic hyphomycete communities among treatments (Primer 6 v6.1.11 & Permanova+ v1.0.1; Primer-E Ltd, Plymouth, UK; Clarke and Gorley 2001).

Data were checked for normality (Shapiro-Wilk's test) and homoscedasticity (Bartlett's test) and transformed when necessary. Analyses were performed using R 3.1.1 (R Core Team 2010), except when indicated otherwise.



## Results

### *Leaf chemical and physical properties*

Senescent leaves from unfertilized and fertilized trees did not significantly differ in toughness, SLA, polyphenols, lignin, C and P concentrations (Table 1). However, fertilization resulted in a significantly higher N concentration in green leaves (3.4×), senescent leaves (2.3×), pre-conditioned leaf discs (2.2×) and conditioned leaf discs (1.7×) when compared to the unfertilized treatment (Table 2 and Online resource 2). Consequently, the C:N ratio was significantly higher in the unfertilized than fertilized treatment for green leaves (3.6×), senescent leaves (2.3×), leaf discs before conditioning (2.3×) and leaf discs after conditioning (1.8×) (Table 2 and Online resource 2).

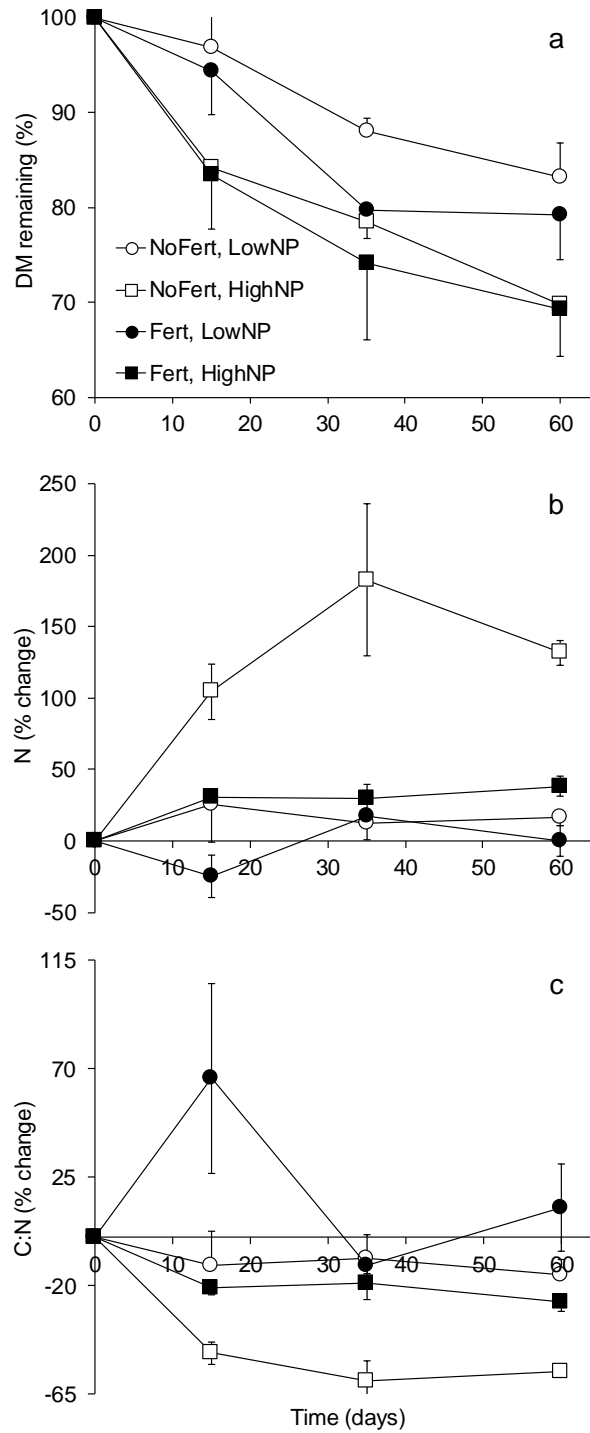
**Table 1** Physical and chemical characteristics (mean  $\pm$  SE, n = 5) of senescent leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) oak trees (*t*-tests with p values).

Leaf characteristics	NoFert	Fert	p
Toughness (g)	162.6 $\pm$ 15.9	176.9 $\pm$ 17.3	0.280
SLA (mm <sup>2</sup> mg <sup>-1</sup> )	13.8 $\pm$ 1.4	12.4 $\pm$ 1.1	0.059
Polyphenolics (% DM)	12.7 $\pm$ 1.9	10.6 $\pm$ 1.6	0.222
Lignin (% DM)	34.3 $\pm$ 1.5	33.9 $\pm$ 1.4	0.431
Carbon (% DM)	47.2 $\pm$ 0.5	47.6 $\pm$ 0.3	0.260
Nitrogen (% DM)	0.60 $\pm$ 0.06	1.36 $\pm$ 0.06	<0.001
Phosphorus (% DM)	0.14 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.01	0.276
Carbon:nitrogen (molar)	95.8 $\pm$ 8.2	41.1 $\pm$ 1.8	<0.001

SLA, specific leaf area; DM, dry mass

**Table 2** Nitrogen and carbon concentration and carbon:nitrogen ratio (C:N) (mean  $\pm$  SE, n = 5) of oak leaves in different stages originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees. DM, dry mass

Leaf state	Fertilization	Nitrogen (% DM)	Carbon (% DM)	C:N (molar)
<i>Green leaves</i>				
	NoFert	0.76 $\pm$ 0.16	50.0 $\pm$ 0.6	64.3 $\pm$ 9.5
	Fert	2.60 $\pm$ 0.43	50.4 $\pm$ 0.6	17.9 $\pm$ 2.6
<i>Senescent leaves</i>				
	NoFert	0.60 $\pm$ 0.06	47.2 $\pm$ 0.5	70.4 $\pm$ 6.0
	Fert	1.36 $\pm$ 0.06	47.6 $\pm$ 0.3	30.2 $\pm$ 1.3
<i>Leaf discs (pre-conditioned)</i>				
	NoFert	0.62 $\pm$ 0.05	47.7 $\pm$ 0.7	71.0 $\pm$ 6.5
	Fert	1.35 $\pm$ 0.06	47.5 $\pm$ 0.4	30.4 $\pm$ 1.2
<i>Leaf discs (post-conditioned)</i>				
	NoFert	0.82 $\pm$ 0.14	47.6 $\pm$ 0.6	54.2 $\pm$ 6.9
	Fert	1.40 $\pm$ 0.06	47.7 $\pm$ 0.3	29.5 $\pm$ 1.5



**Fig. 1** Dry mass (DM) remaining (a), change in nitrogen (N) concentration (b) and change in carbon:nitrogen ratio (C:N) from initial values (c) of leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrient concentrations for 15, 35 and 60 days. Values are means  $\pm$  SE.

Nitrogen concentration in leaves from fertilized trees decreased by 48% with senescence, while no significant reduction occurred in leaves from unfertilized trees; senescence also resulted in a small but significant reduction in C concentration in both fertilized and unfertilized treatments (Table 2 and Online resource 2). There were no significant differences in N and C concentration and in the C:N ratio between senescent leaves and leaf discs before conditioning and between leaf discs before and after conditioning (Table 2 and Online resource 2).

### *Leaf decomposition*

Leaf discs lost 17 – 31 % of their initial mass during the 60 days incubation (Fig. 1a), which translated into decomposition rates ( $k$ ) of 0.0032 – 0.0073 day<sup>-1</sup>. Decomposition rates were significantly faster at high than at low water nutrients concentration (ANCOVA,  $p < 0.001$ ) while there was no significant effect of soil fertilization ( $p = 0.144$ ) or interaction between soil fertilization and water nutrients ( $p = 0.700$ ) (Table 3), despite the effect of the increase in water nutrients concentration on decomposition rates being stronger for leaves from NoFert than Fert trees (2.1× and 1.6×, respectively).

The decomposition rate of leaves from fertilized trees incubated at high nutrients concentration (Fert, HighNP) was significantly faster (2.3×) than that of leaves from unfertilized trees incubated at low nutrients concentration (NoFert, LowNP) (Fisher's test,  $p < 0.001$ ). The observed decomposition rate of leaves from fertilized trees incubated at high nutrients concentration (Fert, HighNP, 0.0073 day<sup>-1</sup>) was 8 % lower than expected (0.0080 day<sup>-1</sup>) based on the individual effects of soil fertilization and increase in water nutrients concentration.

**Table 3** Exponential decomposition rates ( $k$ ) of leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration, standard error (SE) and coefficient of determination of the regression ( $R^2$ ;  $p < 0.001$  in all cases). Treatments with the same letter are not significantly different (ANCOVA followed by Fisher's test,  $p > 0.050$ ).

Fertilization	Water nutrients	$k$ ( $d^{-1}$ )	SE	$R^2$	ANCOVA
NoFert	LowNP	0.0032	0.0005	0.42	a
	HighNP	0.0066	0.0007	0.25	bc
Fert	LowNP	0.0046	0.0007	0.27	ab
	HighNP	0.0073	0.0012	0.03	c

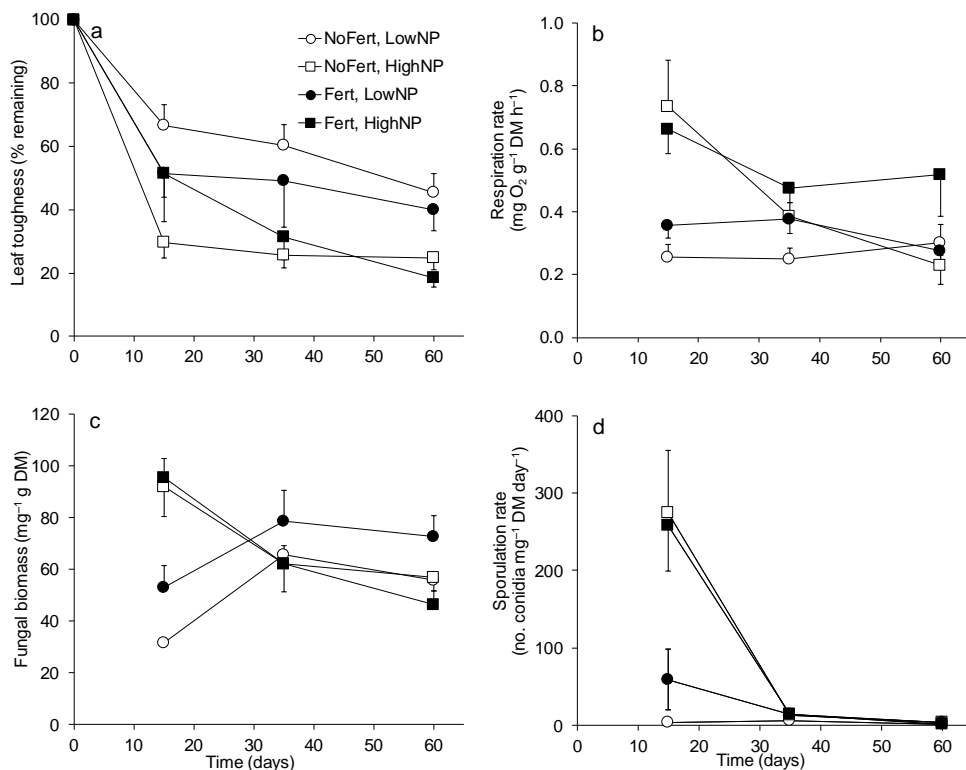
#### *Leaf N concentration and C:N ratio*

Nitrogen concentration in leaves incubated in water with high nutrients increased during decomposition up to days 15 – 35 while no major change was observed in the other treatments (Fig. 1b). There was an effect of soil fertilization and water nutrients on the magnitude of change in N concentration (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.002$  and  $p < 0.001$ ; Fig 1b and Online resource 3). No significant interaction between soil fertilization and water nutrients was detected (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.863$ ; Online resource 3) but the magnitude of change in N was significantly higher for leaves from unfertilized trees at high water nutrients than for any other treatment (Tukey's test,  $p < 0.044$ ) (Fig. 1c).

The C:N ratio dynamics was opposite to that of N. The magnitude of change in the C:N ratio was significantly affected by fertilization (two-way repeated-measures ANOVA,  $p < 0.001$ ), water nutrients concentration ( $p < 0.001$ ), the interaction between both factors ( $p = 0.017$ ) and the interaction between fertilization and time ( $p = 0.014$ ) (Online resource 3). The magnitude of change was significantly higher for leaves from unfertilized trees at high water nutrients than for leaves from any other treatment (Tukey's test,  $p = 0.010$ ) (Fig. 1c).

## Leaf toughness

Leaf toughness decreased sharply during the first two weeks of incubation after which toughness loss was less abrupt (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.020$ ) and it reached 45 – 18 % of the initial value by day 60 (Fig. 2a). Leaf toughness loss was not significantly affected by tree fertilization (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.490$ ), while the effect of water nutrients depended on fertilization ( $p = 0.039$ ) (Online resource 4). For leaves from unfertilized trees, leaf toughness loss was significantly higher at high than low water nutrients (Tukey's test,  $p < 0.001$ ; Fig. 2a). Leaves from fertilized trees incubated at high water nutrients concentration had significantly higher toughness loss than leaves from unfertilized trees incubated at low water nutrients concentration (Tukey's test,  $p = 0.002$ ).



**Fig. 2** Leaf toughness remaining (a), microbial respiration rate (b), fungal biomass (c) and sporulation rate by aquatic hyphomycetes (d) associated with leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrient concentrations for 15, 35 and 60 days. Values are means  $\pm$  SE.

*Microbial respiration*

Microbial respiration rates varied between 0.23 and 0.73 mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup> (Fig. 2b). Respiration rates were already high by day 15 for leaves incubated at high water nutrients and decreased thereafter, while for leaves incubated at low water nutrients concentration respiration rates were relatively stable over the incubation period (Fig. 2b). Respiration rates were significantly affected by water nutrients, with higher values at high than low nutrient concentration (two-way repeated-measures ANOVA,  $p < 0.001$ ), while no significant effect was found for fertilization ( $p = 0.058$ ) or for the interaction between factors ( $p = 0.635$ ) (Online resource 4). There was an effect of time and of the interaction between water nutrient concentration and time (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.013$  and  $0.009$ , respectively; Online resource 4). Microbial respiration rates by day 15 were significantly higher for leaves incubated at high than low water nutrients (Fisher's test,  $p < 0.001$ ; Fig. 2b). At the end of the experiment (day 60), respiration rates were significantly higher for leaves from fertilized trees incubated at high water nutrients than for other treatments (Fisher's test,  $p = 0.008 - 0.051$ ). Leaves from fertilized trees incubated at high water nutrients had significantly higher respiration rates than leaves from unfertilized trees incubated at low water nutrients (Fisher's test,  $p < 0.001 - 0.051$ , depending on the date).

*Fungal biomass*

Fungal biomass varied between 32 and 95 mg g<sup>-1</sup> DM (Fig. 2c); it was already high by day 15 for leaves incubated at high water nutrients and decreased thereafter, while for leaves incubated at low water nutrients concentration, fungal biomass increased until day 35 and stabilized (Fig. 2c). Fungal biomass was not significantly affected by tree fertilization, water nutrients or their interaction (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.868$ ,  $p = 0.087$  and  $p = 0.961$ , respectively; Online resource 4).

*Conidia production by aquatic hyphomycetes*

Sporulation rates by aquatic hyphomycetes were already high by the first sampling date for leaves incubated at high water nutrients concentrations (257 – 274 conidia mg<sup>-1</sup> DM d<sup>-1</sup>) and decreased thereafter, while for leaves incubated at low water nutrients sporulation rates remained low throughout (1 – 59 conidia mg<sup>-1</sup> DM d<sup>-1</sup>) (Fig. 2d). Sporulation rates were significantly affected by fertilization, water nutrients, time and their interaction (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.006$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$  and  $p = 0.034$ , respectively; Online resource 4). Significant difference among treatments only existed on day 15, with fertilization significantly stimulating sporulation rates on low water nutrients concentration (Tukey's test,  $p < 0.001$ ) but not on high water nutrients concentration ( $p = 0.147$ ), and high water nutrients concentration stimulating sporulation rates on leaves from both fertilization treatments ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3d). Leaves from fertilized trees incubated at high water nutrients concentration had significantly higher sporulation rate than leaves from unfertilized trees incubated at low water nutrients concentration on day 15 (Tukey's test,  $p < 0.001$ ).

### *Fungal assemblages*

A total of 15 aquatic hyphomycete species were found across treatments (Table 4). The cumulative number of aquatic hyphomycete species sporulating per treatment varied between 11 and 14 (Table 4). Fertilization, water nutrients concentration and their interaction affected aquatic hyphomycete species richness (two-way repeated-measures ANOVA,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$  and  $p = 0.002$ , respectively; Online resource 4). Leaves from fertilized trees had significantly higher species richness than leaves from unfertilized trees incubated at low water nutrients concentration (Tukey's test,  $p < 0.001$ ). Also, leaves from unfertilized trees incubated at high water nutrients concentration had higher species richness than leaves incubated at low water nutrients (Tukey's test,  $p < 0.001$ ). Species richness was significantly higher on leaves from fertilized trees incubated at high water nutrients concentration than on leaves from unfertilized trees incubated at low water nutrients concentration (Tukey's test,  $p < 0.001$ ).

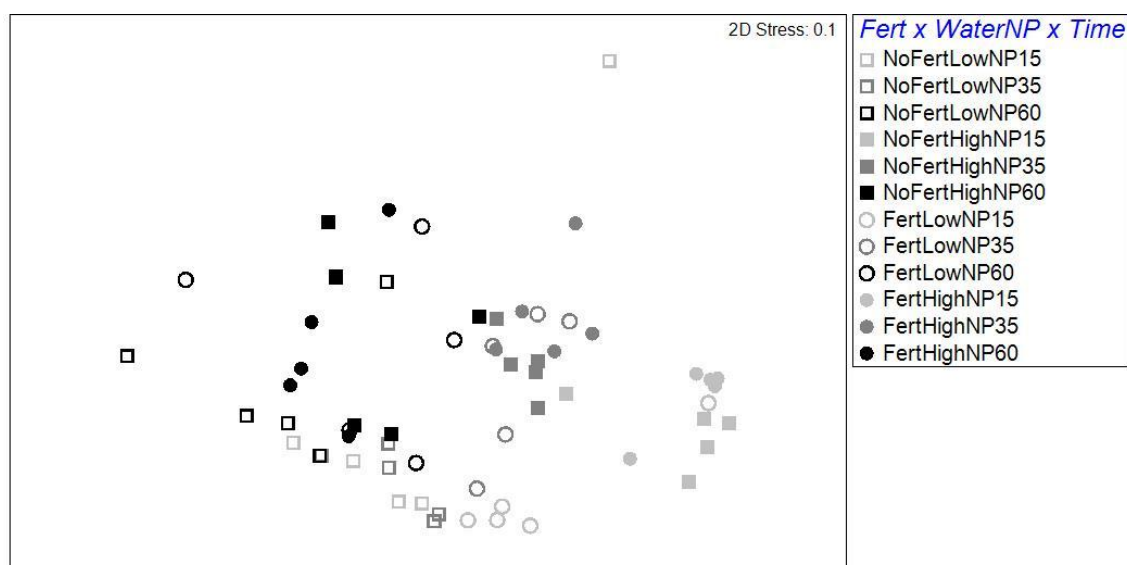
**Table 4** Relative abundance (%) of aquatic hyphomycete species (based on conidial numbers) associated with leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrients concentration for 15, 35 and 60 days.

Aquatic hyphomycete species	NoFert, LowNP			NoFert, HighNP			Fert, LowNP			Fert, HighNP		
	15	35	60	15	35	60	15	35	60	15	35	60
<i>Alatospora acuminata</i>	13.1	0.1		1.3	3.3	1.0	0.1	5.6	0.9	1.0	11.6	1.2
<i>Clavariopsis aquatica</i>	3.9		0.7	6.0	0.9	0.8	1.1	1.6		4.3	1.8	0.4
<i>Clavatospora longibrachiata</i>		0.9	11.8	4.2	29.5	9.4	1.2	9.9	12.3	1.9	28.6	23.2
<i>Flagellospora curvula</i>			0.6	1.1	0.2	0.3	1.2	0.5		0.1		
<i>Goniopila monticola</i>				0.1		0.2						
<i>Lemonniera terrestris</i>	2.0	1.9	2.3	1.2		0.5	3.1	2.0	5.1	2.6	0.2	1.3
<i>Lunulospora curvula</i>	0.8	0.1			0.2		0.1	0.1				
<i>Tetrachaetum elegans</i>	78.2	94.9	79.8	45.1	39.5	49.8	78.8	45.3	50.1	44.0	24.0	57.1
<i>Tetracladium marchalianum</i>	0.1											
<i>Tricladium chaetocladium</i>	1.2	1.6	1.4	35.1	22.3	31.4	10.1	31.2	18.6	39.3	30.2	8.1
<i>Tricladium splendens</i>	0.1		0.1			0.3	0.4	0.5	0.1	1.0	0.6	5.9
Unidentified tetra radiate sp1			1.9		0.2	0.8	1.2	0.2	2.9	4.2	2.9	2.8
Unidentified tetra radiate sp2		0.5	1.4	5.9	2.6	4.6	2.7	1.6	3.7	1.3	0.1	
Unidentified tetra radiate sp3	0.6				1.3	0.7		1.5	6.3			
Unidentified triradiate sp1						0.2				0.3		
Species richness (no. species treatment <sup>-1</sup> )	9	7	9	9	10	13	11	12	9	11	9	8



In general, three aquatic hyphomycete species, *Tetrachaetum elegans*, *Tricladium chaetocladium* and *Clavatospora longibrachiata*, made up > 80 % of total conidial production. *T. elegans* was the dominant species in all treatments (42 – 84 %), followed by *T. chaetocladium* (20 – 30 %) and *C. longibrachiata* (4 – 18 %) (Table 4).

Aquatic hyphomycete community structure significantly differed among fertilization (ANOSIM, global R = 0.13, p = 0.004), water nutrients concentration (global R = 0.25, p = 0.001) and time (global R = 0.54, p = 0.001; Fig. 3). Considering the four treatments altogether, significant differences were observed among all treatments (ANOSIM, R > 0.17, p < 0.028), except between leaves from fertilized trees at low water nutrients and leaves from unfertilized trees at high water nutrients (ANOSIM, R = 0.17, p = 0.053; Fig. 3). In particular, communities on leaves from fertilized trees incubated at high water nutrients concentrations significantly differed from those on leaves from unfertilized trees incubated at low water nutrients concentration (ANOSIM, R = 0.54, p = 0.002; Fig 3).



**Fig. 3** Ordination (NMDS) of aquatic hyphomycete communities (based on conidial production) associated with leaves originating from unfertilized (NoFert) and fertilized (Fert) trees and incubated in laboratory microcosms under low (LowNP) and high (HighNP) nutrient concentrations for 15, 35 and 60 days.

**Discussion**

Here we assessed the direct (water) and indirect (leaf chemistry) effects of nutrient enrichment on leaf litter decomposition and associated microbial decomposers in laboratory microcosms. We showed that microbial decomposers and litter decomposition were stimulated by increases in both dissolved nutrients and leaf N concentration. However, nutrients in water had a stronger effect on litter decomposition and microbial activity.

*Soil fertilization increases leaf nutrient concentration*

Our hypothesis that soil fertilization influences the chemical composition of the leaves was partially supported, with leaf N concentration being  $> 3\times$  higher in leaves from fertilized than unfertilized trees. It has been noted before that increases in soil N availability due to N fertilization promote leaves with higher nutrient concentration (Bryant et al. 1987; Lawler et al. 1997; Huang et al. 2008; Liu et al. 2010). Other studies have also shown that soil fertilization results in decreased concentration of condensed tannins (Bryant et al. 1987) and that low soil nutrient availability leads to higher levels of both total phenolics and condensed tannins (Lawler et al. 1997), but these changes were not observed in our case.

Green leaves from fertilized trees had twice the N concentration of senescent leaves suggesting that there was substantial (~ 50%) resorption of N during senescence. Nutrient resorption is one of the conservation mechanisms that can increase nutrient use efficiency and minimize the dependence of deciduous plants on external nutrient uptake (Norby et al. 2001; Yuan and Chen 2009). Although there is wide variation among species in nutrient resorption efficiency, typically 50% of both the leaf N and P are recycled via resorption (Aerts 1996). Contrary to what we anticipated, no significant N resorption was observed for leaves from unfertilized trees. Generally, plants in infertile habitats have a higher rate of nutrient resorption than those in fertile habitats, which enables them to reuse nutrients more efficiently (Yuan and Chen 2015). However, this hypothesis remains controversial with some studies reporting N and P resorption not linked to

plant nutrient status (Chapin and Moilanen 1991; Aerts 1996) and others showing that that resorption depends on soil nutrient concentration (Wright and Westoby 2003; Vergutz et al. 2012). It is plausible that the resorption efficiency decreases with the decrease in the total amount of N in leaves because more energy would be needed to mobilize the small amount of nutrients remaining in leaves. We also observed that in the unfertilized treatment senescence started ~ 20 days earlier than in the fertilized treatment. Maybe this earlier senescence affected nutrient resorption because leaves shed before reabsorption is completed. Despite N resorption only occurring in leaves from fertilized trees, after senescence these leaves still had 2.3× higher N concentration than leaves from unfertilized trees. Effects of fertilization on leaf chemistry can thus prevail after senescence, potentially affecting detrital food webs.

Nitrogen concentration and the C:N ratio did not significantly differ between discs and senescent leaves, and the relative differences in N concentration between fertilization levels were maintained when considering leaf discs. Thus, leaf discs were good surrogates for senescent leaves. Incubation of leaf discs for one week prior to the microcosm experiment induced an increase in N concentration and a decrease in C:N ratio in discs, which was likely due, on one hand, to the leaching of soluble compounds such as polyphenols and simple sugars, and, on the other hand, to microbial colonization and nitrogen immobilization (Gulis and Suberkropp 2003b). The difference in N concentration between fertilization treatments was mitigated during conditioning, but at the beginning of the experiment leaves from fertilized trees still had significantly higher N concentration than leaves from unfertilized trees.

#### *Water nutrient enrichment stimulates decomposers activities and litter decomposition*

In agreement with our prediction, water nutrient enrichment stimulated microbial activity, with microbial respiration, and conidia production peaking earlier and at higher values when dissolved nutrient availability was high. These results were expected and are well documented in laboratory microcosms (Suberkropp 1998; Gulis and Suberkropp 2003a; Ferreira and Chauvet

2011a; Fernandes et al. 2014), whole-stream nutrient addition experiments (Gulis and Suberkropp 2003a; Gulis et al. 2004; Ferreira et al. 2006) and field correlative studies (Rosemond et al. 2002; Gulis et al. 2006).

Microbial decomposers are richer in N and P than the substrates they grow on (Zechmeister-Boltenstern et al. 2015) and thus the microbial growth rate or production is generally limited by the relative low leaf nutrient concentration (Griffiths et al. 2012). Since microbes can retrieve nutrients from both the litter and the water column, an increase in dissolved nutrient availability generally stimulates microbial activity (this study; Gulis and Suberkropp 2003a, b; Ferreira et al. 2006). The activity of microbial decomposers, in particular aquatic hyphomycetes, promotes litter mass loss by multiple pathways. Mineralization of organic C through respiration generally accounts for a large portion of litter mass loss (in the form of CO<sub>2</sub>; Hieber and Gessner 2002; Gulis and Suberkropp 2003b; Cornut et al. 2010; Ferreira and Chauvet 2011a, b). The activity of fungal extracellular enzymes promotes litter maceration and facilitates the release of fine particulate organic matter (Arsuffi and Suberkropp 1985; Bärlocher and Sridhar 2014), which is an important food resource for collector and filtering invertebrates. The incorporation of litter C into microbes and the immobilization of dissolved N by microbial biomass renders leaf material a more palatable and nutritious food resource for shredding invertebrates (Gulis and Suberkropp 2003a; Gulis et al. 2006). Finally, the incorporation of litter C into conidia and their subsequent release also manifests in litter mass loss (Gulis and Suberkropp 2003b; Cornut et al. 2010; Ferreira and Chauvet 2011a, b). Thus, human-induced increases in nutrient availability influence the course of decomposition and nutrient cycling within the ecosystem as reported in many studies on nutrient enrichment (e.g. Woodward et al. 2012; Ferreira et al. 2015).

*Increases in litter nutrient concentration stimulate decomposers activities and litter decomposition when dissolved nutrient availability is low*

In partial agreement with our prediction, leaves from fertilized trees decomposed faster than leaves from unfertilized trees when dissolved nutrients were low. Litter decomposition is generally faster for high quality (high N concentration) than for low quality litter, as microbial colonization and activity are generally higher in the former substrate (Gessner and Chauvet 1994; Gulis and Suberkropp 2003a; Schindler and Gessner 2009; Ferreira et al. 2012; Frainer et al. 2015). However, differences in decomposer activity and litter decomposition between leaves from fertilized and unfertilized trees only when dissolved nutrient availability was low suggests that under low water nutrient concentrations litter microbial decomposers need to return to the litter as a source of N and P (Gulis and Suberkropp 2003a, b; Ferreira et al. 2006; Gulis et al. 2006). When microbial decomposers are exposed to high concentrations of dissolved nutrients the effects of differences in leaf quality are mitigated, since microbes may satisfy their nutrient requirements from the water. These results indicate a shift in the main source of nutrients for microbial decomposers between the litter (when dissolved nutrient availability is low) and the water (when dissolved nutrient availability is high) and can be interpreted as a strategy of microbial decomposers to save energy since lower energetic investment is needed to retrieve dissolved nutrients versus litter nutrients (Suberkropp and Chauvet 1995; Suberkropp 1998).

The immobilization of N by fungi on leaves from unfertilized trees was higher at high than at low dissolved nutrient concentrations. These results suggest that the magnitude of the response to nutrient enrichment may be driven in part by the initial nutrient concentration of the substrate. Like all living organisms, heterotrophic microbes are fundamentally constrained by the supply of C, N, P and other essential elements available for growth and reproduction (Suberkropp 1998). Microbial decomposers associated with substrates of low nutrient concentration depend more on external (dissolved) nutrients for growth and reproduction, whereas microbial decomposers colonizing substrates of high nutrient concentration may have a lesser need for external nutrients (Pozo et al. 1998; Gulis et al. 2004).

It is plausible the nutrient enrichment effect on microbial activity and litter decomposition could be stronger than that reported here. We cannot exclude unmeasured changes in leaf discs during microbial inoculation in the week prior to the microcosms experiment. Those changes could include early decomposition with mineralization of leaf C and transfer of leaf C into fungal conidia and would explain why microbial respiration, fungal biomass and conidial production by aquatic hyphomycetes were already high on the first sampling date (d15) and declined thereafter. Other studies observed the peak in microbial activity on decomposing litter in streams already by day 7 (Gulis et al. 2006; Ferreira and Graça 2016), which was the period we used for discs conditioning.

*Fertilization and increases in dissolved nutrients affected aquatic hyphomycete communities*

Soil fertilization and water nutrient enrichment affected the aquatic hyphomycete community structure. It has been reported previously that conditions with moderate nutrient availability may support higher number of species than conditions with low nutrient availability (Gulis and Suberkropp 2003a; Pascoal et al. 2005; Ferreira et al. 2006), which is consistent with several hypothesis relating ecosystem productivity with diversity (e.g. Tilman et al. 1997). Also, conditions with higher nutrient availability may support higher number of species at a given time due to a release of interspecific competition for resources (Gulis and Suberkropp 2003a; Pereira et al. 2016). Different aquatic hyphomycete communities are likely a consequence of species differing in enzymatic performance (Chandrashekar and Kaveriappa 1988) and chemical composition (Bisht 2013; Grimmett et al. 2013; Danger et al. 2016) and thus having distinct enzymatic capabilities to decompose substrates and distinct nutrient requirements (Bisht 2013). Other studies have shown changes in fungal community structure in woodland streams with nutrient enrichment (Gulis and Suberkropp 2004; Artigas et al. 2008). As detritivores have preferences for certain fungal species (Chung and Suberkropp 2009; Cornut et al. 2015), changes in aquatic hyphomycete community structure with nutrient enrichment likely have consequences for the invertebrate fauna feeding on decaying organic matter and on the higher trophic levels in such streams.

*Simultaneous increases in water and litter nutrient concentration stimulate decomposers and litter decomposition: a global change effect*

Nutrient availability in streams and soil is likely to keep increasing due to human population growth, intensification of agriculture and other human activities. Our results show that when both litter and water nutrients concentration increase, microbial activity and leaf decomposition are stimulated. The interaction between increased litter nutrient concentration and increased dissolved nutrient availability was, nevertheless, additive as it was predicted from the individual effects of increases in litter N concentration alone plus those in dissolved nutrient availability alone. The stimulation of microbial activity and litter decomposition by simultaneous increases in litter and water nutrient availability was driven by the increase in dissolved nutrients. Thus, the direct effects of increases in nutrient availability are stronger than those mediated by increases in litter N concentration (indirect effects).

Our results indicate that future increases in nutrient availability (in the range used in this study) may exert a stronger control on microbial activity and litter decomposition through increases in water nutrients than litter nutrients. Fast decomposition of organic matter entering the streams in autumn under nutrient rich conditions may lead to food depletion at higher trophic levels later in the year as litter may disappear from the streambed faster (Poff et al. 2002). The rate at which litter decomposes under nutrient rich conditions may be accelerated by the activities of shredder detritivores that take advantage of the improved litter quality by enhanced microbial activity (e.g. Tonello et al. 2016).

## **Acknowledgments**

This study was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) through the strategic project UID/MAR/04292/2013 granted to MARE. We thank the FCT for the financial support granted to Verónica Ferreira (IF/00129/2014), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship granted to Cristiane Biasi (Process No.:

99999.006609/2015-05) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity grant granted to Sandro Santos (Process No.: 311142/2014-I).

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

Aerts R (1996) Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: are there general patterns? *J Ecol* 84: 597–608 doi: 10.2307/2261481

APHA (American Public Health Association) (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. APHA, Washington, DC

Ardón M, Pringle CM, Eggert SL (2009) Does leaf chemistry differentially affect breakdown in tropical vs temperate streams? Importance of standardized analytical techniques to measure leaf chemistry. *J N Am Benthol Soc* 28: 440–453 doi: 10.1899/07-083.1

Arsuffi TL, Suberkropp K (1985) Selective feeding by stream caddisfly (Trichoptera) detritivores on leaves with fungal-colonized patches. *Oikos* 45: 50–58 doi: 10.2307/3565221

Artigas J, Romaní AM, Sabater S (2008) Effect of nutrients on the sporulation and diversity of aquatic hyphomycetes on submerged substrata in a Mediterranean stream. *Aquat Bot* 88: 32–38 doi: 10.1016/j.aquabot.2007.08.005

Bärlocher F, Sridhar KR (2014) Association of animals and fungi in leaf decomposition. In: Jones EBG, Hyde KD, Pang KL. (Eds.), *Freshwater fungi and Fungal-like Organisms*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 412–441

Bisht S (2013) Growth responses of aquatic hyphomycetes to different sources of carbon and nitrogen. *J Appl Natl Sci* 5: 313–317

Bowman WD, Gleveland CO, Halada L, Hresko J, Baron JL (2008) Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. *Nat Geosc* 1: 767–770 doi: 10.1038/ngeo339



Bryant JP, Clausen TP, Reichardt PB, McCarthy MC, Werner RA (1987) Effect of nitrogen fertilization upon the secondary chemistry and nutritional value of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) leaves for the large aspen tortrix ((*Choristoneura conflictana* (Walker))).

Oecologia 73:513–517 doi: 10.1007/BF00379408

Chandrashekar KR, Kaveriappa, KM (1988) Production of extracellular enzymes by aquatic hyphomycetes. Folia Microbiol 33: 55–58 doi: 10.1007/BF02928015

Chapin FS, Moilanen L (1991) Nutritional controls over nitrogen and phosphorus resorption from Alaskan birch leaves. Ecology 72: 709–715 doi: 10.2307/2937210

Clarke KR, Gorley RN (2001) Primer v5: user manual/tutorial. Primer-E, UK, Plymouth

Cornut J, Elger A, Lambrigot D, Marmonier P, Chauvet E (2010) Early stages of leaf decomposition are mediated by aquatic fungi in the hyporheic zone of woodland streams. Freshw Biol 55: 2541–2556 doi: 10.1111/j.1365-2427.2010.02483.x

Cornut J, Ferreira V, Gonçalves AL, Chauvet E, Canhoto C (2015) Fungal alteration of the elemental composition of leaf litter affects shredder feeding activity. Freshw Biol 60: 1755–1771 doi: 10.1111/fwb.12606

Chung N, Suberkropp K (2009) Effects of aquatic fungi on feeding preferences and bioenergetics of *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). Hydrobiologia 630: 257–269 doi: 10.1007/s10750-009-9820-y

Danger M, Gessner MO, Bärlocher F (2016) Ecological stoichiometry of aquatic fungi: current knowledge and perspectives. Fungal Ecol 19: 100–111 doi: 10.1016/j.funeco.2015.09.004

Fernandes I, Seena S, Pascoal C, Cássio F (2014) Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. Freshw Biol 59: 2390–2399 doi: 10.1111/fwb.12445

Ferreira V, Castagnyrol B, Koricheva J, Gulis V, Chauvet E, Graça MAS (2015) A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams. Biol Rev 90: 669–688 doi: 10.1111/brv.12125

Ferreira V, Chauvet E (2011a) Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Glob Change Biol* 17: 551–564 doi: 10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x

Ferreira V, Chauvet E (2011b) Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia* 167: 279–291 doi: 10.1007/s00442-011-1976-2

Ferreira V, Encalada AC, Graça MA (2012) Effects of litter diversity on decomposition and biological colonization of submerged litter in temperate and tropical streams. *Freshw Sci* 31: 945–962 doi: 10.1899/11-062.1

Ferreira V, Graça MA (2016) Effects of whole-stream nitrogen enrichment and litter species mixing on litter decomposition and associated fungi. *Limnologia* 58: 69–77 doi: 10.1016/j.limno.2016.03.002

Ferreira V, Gulis V, Graça MAS (2006) Whole stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. *Oecologia* 149: 718–729 doi: 10.1007/s00442-006-0478-0

Frainer A, Jabiol J, Gessner MO, Bruder A, Chauvet E, McKie BG (2015) Stoichiometric imbalances between detritus and detritivores are related to shifts in ecosystem functioning. *Oikos* 125: 861–871 doi: 10.1111/oik.02687

Galloway JN, Cowling EB (2002) Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio* 31: 64–71 doi: 10.1579/0044-7447-31.2.64

Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320: 889–892 doi: 10.1126/science.1136674

Gessner MO, Chauvet E (1993) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Appl Environ Microbiol* 59: 502–507

- Gessner MO, Chauvet E (1994) Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology* 75: 1807–1817 doi: 10.2307/1939639
- Goering HK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural handbook*. US Department of Agriculture, Washington, DC, pp 1–2
- Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO (2005) *Methods to study litter decomposition. A practical guide*. Springer, The Netherlands, Dordrecht
- Graça MAS, Cressa C (2010) Leaf quality of some tropical and temperate tree species as food resource for stream shredders. *Internat Rev Hydrobiol* 95: 97–41 doi: 10.1002/iroh.200911173
- Graça MA, Poquet JM (2014) Do climate and soil influence phenotypic variability in leaf litter, microbial decomposition and shredder consumption? *Oecologia* 174: 1021–32 doi: 10.1007/s00442-013-2825-2
- Griffiths BS, Spilles A, Bonkowski M (2012) C:N:P stoichiometry and nutrient limitation of the soil microbial biomass in a grazed grassland site under experimental P limitation or excess. *Ecol Proc* 1: 6 doi: 10.1186/2192-1709-1-6
- Grimmett IJ, Shipp KN, Macneil A, Bärlocher F (2013) Does the growth rate hypothesis apply to aquatic hyphomycetes? *Fungal Ecol* 6: 493–500 doi: 10.1016/j.funeco.2013.08.002
- Gulis V, Ferreira V, Graça MAS (2006) Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. *Freshw Biol* 51: 1655–1669 doi: 10.1111/j.1365-2427.2006.01615.x
- Gulis V, Rosemond AD, Suberkropp K, Weyers HS, Benstead JP (2004) The effect of nutrient enrichment on the decomposition of wood and associated microbial activity in streams. *Freshw Biol* 49: 1437–1447 doi: 10.1111/j.1365-2427.2004.01281.x
- Gulis V, Suberkropp K (2003a) Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. *Freshw Biol* 48: 123–134 doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.00985.x

Gulis V, Suberkropp K (2003b) Effects of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microb Ecol* 45: 11–19 doi: 10.1007/s00248-002-1032-1

Hieber M, Gessner MO (2002) Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* 83: 1026–1038 doi: 10.2307/3071911

Holland EA, Braswell BH, Sulzman, J, Lamarque JF (2005) Nitrogen deposition onto the United States and Western Europe: synthesis of observations and models. *Ecol Appl* 15: 38–57 doi: 10.1890/03-5162

Huang JY, Zhu XG, Yuan ZY, Song SH, Li X, Li LH (2008) Changes in nitrogen resorption traits of six temperate grassland species along a multi-level N addition gradient. *Plant Soil* 306: 149–158 doi: 10.1007/s11104-008-9565-9

Lawler IR, Foley WJ, Woodrow IE, Cork SJ (1997) The effects of elevated CO<sub>2</sub> atmospheres on the nutritional quality of *Eucalyptus* foliage and its interaction with soil nutrient and light availability. *Oecologia* 109: 59–68 doi: 10.1007/s004420050058

Lecerf A, Chauvet E (2008) Intraspecific variability in leaf traits strongly affects alder leaf decomposition in a stream. *Basic Appl Ecol* 9: 598–605 doi: 10.1016/j.baae.2007.11.003

LeRoy CJ, Whitham TG, Wooley SC, Marks JC (2007) Within-species variation in foliar chemistry influences leaf-litter decomposition in a Utah river. *J N Am Benthol Soc* 26: 426–438 doi: 10.1899/06-113.1

Liu P, Huang J, Sun JO, Han X (2010) Litter decomposition and nutrient release as affected by soil nitrogen availability and litter quality in a semiarid grassland ecosystem. *Oecologia* 162:771–780 doi: 10.1007/s00442-009-1506-7

Liu X, Zhang Y, Han W, Tang A, Shen J, Cui Z, Vitousek P, Erisman JW, Goulding K, Christie P, Fangmeier A, Zhang F (2013) Enhanced nitrogen deposition over China. *Nature* 7438: 459–462 doi: 10.1038/nature11917

MEA (Millennium Ecosystem Assessment) (2005) *Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis*. Island Press, USA, Washington, DC

Meunier CL, Gundale MJ, Sanchez IS, Liess A (2016) Impact of nitrogen deposition on forest and lake food webs in nitrogen-limited environments. *Glob Chang Biol* 22: 164–179 doi: 10.1111/gcb.12967

Norby RJ, Cotrufo MF, Ineson P, O'Neill EG, Canadell JG (2001) Elevated CO<sub>2</sub>, litter chemistry, and decomposition: a synthesis. *Oecologia* 127:153–165 doi: 10.1007/s004420000615

Pascoal C, Cássio F (2004) Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Appl Environ Microbiol* 70: 5266–5273 doi: 10.1128/AEM.70.9.5266-5273.2004

Pascoal C, Cássio F, Marvanová L (2005) Anthropogenic stress may affect aquatic hyphomycete diversity more than leaf decomposition in a low-order stream. *Arch Hydrobiol* 162: 481–496 doi: 10.1127/0003-9136/2005/0162-0481

Pereira A, Geraldes P, Lima-Fernandes E, Fernandes I, Cássio F, Pascoal C (2016) Structural and functional measures of leaf-associated invertebrates and fungi as predictors of stream eutrophication. *Ecol Ind* 69: 648–656 doi: 10.1016/j.ecolind.2016.05.017

Poff NL, Brinson MM, Day JW Jr (2002) *Aquatic ecosystems and global climate change. Potential impacts on inland freshwater and coastal wetland ecosystems in the United States*. Pew Center on Global Climate Change, USA, Arlington

Pozo J, Basaguren A, Elosegui A, Molinero J, Fabre E, Chauvet E (1998) Afforestation with *Eucalyptus globulus* and leaf litter decomposition in streams of northern Spain. *Hydrobiologia* 373/374: 101–109 doi: 10.1023/A:1017038701380

R Core Team (2014) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Available at: <http://www.R-project.org/>

Reich PB, Oleksyn J (2004) Global patterns of plant leaf N and P in relation to temperature and latitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11001–11006 doi: 10.1073/pnas.0403588101

Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin F, Lambin EF, Lenton TM, Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ, Nykvist B, de Wit CA, Hughes T, van der Leeuw S, Rodhe H, Sorlin S, Snyder PK, Costanza R, Svedin U, Falkenmark M, Karlberg L, Corell RW, Fabry VJ, Hansen J, Walker B, Liverman D, Richardson K, Crutzen P, Foley JA (2009) A safe operating space for humanity. *Nature* 461: 472–475 doi: 10.1038/461472a

Rosemond AD, Pringle CM, Ramírez A, Paul MJ, Meyer JL (2002) Landscape variation in phosphorus concentration and effects on detritus-based tropical streams. *Limnol Oceanogr* 47: 278–289 doi: 10.4319/lo.2002.47.1.0278

Schindler MH, Gessner MO (2009) Functional leaf traits and biodiversity effects on litter decomposition in a stream. *Ecology* 90: 1641–1649 doi: 10.1890/08-1597.1

Suberkropp K (1998) Effect of dissolved nutrients on two aquatic hyphomycetes growing on leaf litter. *Mycol Res* 102: 998–1002 doi: 10.1017/S0953756297005807

Suberkropp K, Chauvet E (1995) Regulation of leaf breakdown by fungi in streams: influences of water chemistry. *Ecology* 76: 1433–1445 doi: 10.2307/1938146

Tilman D, Lehman CL, Thomson KT (1997) Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 1857–1861 doi: 10.1073/pnas.94.5.1857

Tonello G, Naziloski LA, Tonin A, Restello RM, Hepp LU (2016) Effect of *Phylloicus* on leaf breakdown in a subtropical stream. *Limnetica* 35:243–252

Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, Sedell JR, Cushing CE (1980) The river continuum concept. *Can J Fish Aquat Sci* 37:130–137 doi: 10.1139/f80-017

Vergutz L, Manzoni S, Porporato A, Novais RF, Jackson RB (2012) Global resorption efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial plants. *Ecol Monogr* 82: 205–220 doi: 10.1890/11-0416.1

Wallace JB, Eggert SL, Meyer JL, Webster JR (1997) Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277: 102–104 doi: 10.1126/science.277.5322.102

Woodward G, Gessner MO, Giller PS, Gulis V, Hladyz S, Lecerf A, Malmqvist B, McKie BG, Tiegs SD, Cariss H, Dobson M, Eloisegi A, Ferreira V, Graça MAS, Fleituch T, Lacoursière J, Nistorescu M, Pozo J, Risnoveanu G, Schindler M, Vadineanu A, Vought LB-M, Chauvet E (2012) Continental-scale effects of nutrient pollution on stream ecosystem functioning. *Science* 336: 1438–1440 doi: 10.1126/science.1219534

Wright IJ, Westoby M (2003) Nutrient concentration, resorption and lifespan: Leaf traits of Australian sclerophyll species. *Funct Ecol* 17:10–19 doi: 10.1046/j.1365-2435.2003.00694.x

Yuan Z, Chen HYH (2009) Global trends in senesced-leaf nitrogen and phosphorus. *Global Ecol Biogeogr* 18: 532–542 doi: 10.1111/j.1466-8238.2009.00474.x

Yuan Z, Chen HYH (2015) Negative effects of fertilization on plant nutrient resorption. *Ecology* 96: 373–380 doi: 10.1890/14-0140.1

Zechmeister-Boltenstern S, Keiblinger KM, Mooshammer M, Penuelas J, Richter A, Sardans J, Wanek W (2015) The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecol Monogr* 85: 133–155 doi: 10.1890/14-0777.1

Zhang L, Jacob DJ, Knipping EM, Kumar N, Munger JW, Carouge CC, Donkelaar AV, Wang YX, Chen D (2012) Nitrogen deposition to the United States: distribution, sources, and processes. *Atmos Chem Phys* 12: 4539–4554 doi: 10.5194/acp-12-4539-2012

**Electronic supplemental material**

Nutrient enrichment in water more than in leaves affects aquatic microbial litter processing

Cristiane Biasi<sup>1\*</sup>, Manuel A.S. Graça<sup>2</sup>, Sandro Santos<sup>1</sup>, Verónica Ferreira<sup>2</sup>

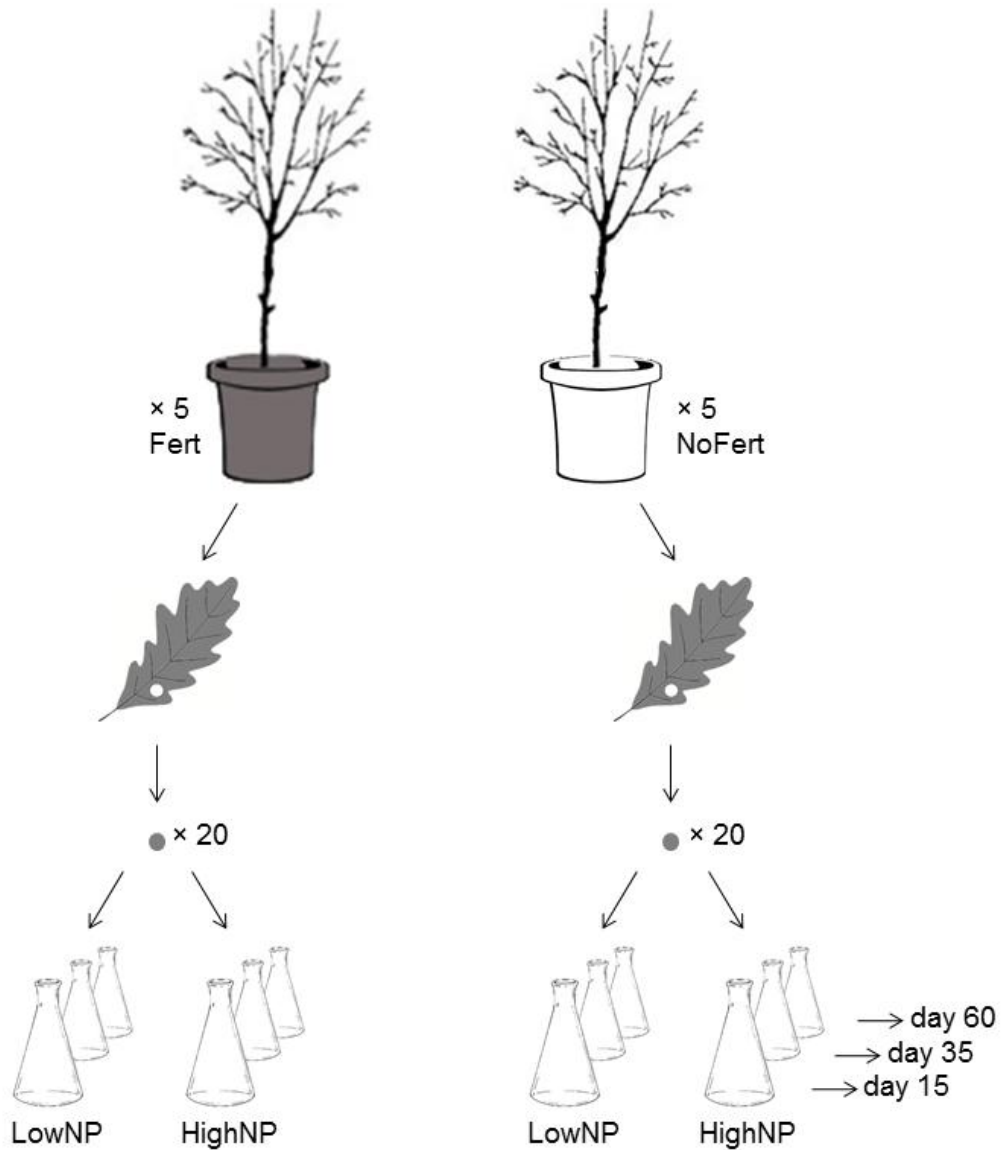
<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Animal Biodiversity, Ecology and Evolution Department, Center of Natural and Exact Sciences, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima, 1000, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Largo Marquês de Pombal, 3004-517 Coimbra, Portugal

\*Corresponding author: C. Biasi; [cristiane.biasi@gmail.com](mailto:cristiane.biasi@gmail.com)



Online resource 1. Experimental design showing the unfertilized and fertilized trees ( $n = 5$  each), from which senescent leaves were collected to be used in the laboratory microcosm experiment. Sets of 20 leaf discs from each tree are incubated under low (LowNP) or high (HighNP) nutrients concentration ( $n = 3$  per tree and nutrient level) and microcosms were sacrificed after 15, 35 and 60 days ( $n = 1$  per tree and nutrient level).



Online resource 2. Summary table for two-way ANOVAs performed on nitrogen and carbon concentration and carbon:nitrogen ratio (C:N) of leaves in different states (Leaf state) originating from unfertilized and fertilized trees (Fertilization).

Sources of variation	Df	Nitrogen		Carbon		C:N	
		F	p	F	P	F	p
<i>Green leaves × Senescent leaves</i>							
Fertilization	1	58.88	<0.001	0.23	0.641	48.58	<0.001
Leaf state	1	8.95	0.009	30.00	<0.001	2.50	0.134
Fertilization × Leaf state	1	5.59	0.031	<0.01	0.991	0.42	0.526
<i>Senescent leaves × Leaf discs (pre-conditioned)</i>							
Fertilization	1	160.87	<0.001	0.03	0.869	79.65	<0.001
Leaf state	1	0.30	0.593	0.09	0.765	0.13	0.721
Fertilization × Leaf state	1	0.01	0.945	0.48	0.500	0.01	0.936
<i>Leaf discs: pre-conditioned × post-conditioned</i>							
Fertilization	1	55.09	<0.001	0.02	0.889	44.13	<0.001
Leaf state	1	1.44	0.247	0.01	0.945	2.12	0.166
Fertilization × Leaf state	1	1.41	0.253	0.13	0.725	2.91	0.109

Online resource 3. Summary table for two-way repeated-measures ANOVAs performed on % change of nitrogen concentration and % change of carbon:nitrogen ratio (C:N) of leaves originating from unfertilized and fertilized trees (Fertilization) and incubated in laboratory microcosms under two nutrients concentration (WaterNP) over time (3 sampling dates; Time).

Sources of variation	df	Nitrogen		C:N	
		F	p	F	p
Intercept	1	13.93	<0.001	15.34	<0.001
Fertilization	1	10.64	0.002	19.73	<0.001
WaterNP	1	25.09	<0.001	38.09	<0.001
Time	2	2.52	0.092	2.40	0.100
Fertilization × WaterNP	1	0.03	0.863	6.04	0.017
Fertilization × Time	2	11.37	0.077	69.53	0.014
WaterNP × Time	2	1.23	0.300	0.17	0.840
Fertilization × WaterNP × Time	2	0.08	0.803	1.94	0.298
Error	42				





## CONCLUSÕES GERAIS

Com este estudo reconheci importantes fatores que regulam a decomposição foliar mediada por fragmentadores e fungos decompositores em riachos subtropicais e temperados. Este estudo é pioneiro ao levantar a lista de espécies de Hifomicetos para a região sul do Brasil. Registre nove espécies de hifomicetos no riacho estudado, o que representa ~3% do total de espécies do grupo (~290) para ambientes aquáticos no mundo. Com este registro da diversidade de hifomicetos verifiquei que a riqueza de espécies da região subtropical é menor que a riqueza de espécies da região temperada (~20 espécies), entretanto é maior que a região tropical (~7 espécies). Futuros trabalhos sobre a diversidade deste grupo de fungos na região subtropical são necessários para abranger maior número de sistemas aquáticos e tipos de substrato.

No Capítulo 1 verifiquei que os fatores intrínsecos das espécies que compõem a vegetação ripária exercem efeito na atividade dos fungos e na atividade do fragmentador *Phylloicus*, determinando assim, as taxas de decomposição foliar. Evidenciei que os compostos estruturais das plantas, especialmente dureza e lignina são fatores negativamente relacionados com a colonização microbiana e com a atividade alimentar dos fragmentadores subtropicais. Ainda neste estudo encontrei relação positiva entre a abundância de *Phylloicus* de riachos subtropicais e folhas mais macias e condicionadas pelos fungos, confirmando os resultados do ensaio laboratorial. Encontrei alta abundância de *Phylloicus*, embora tenha evidenciado variabilidade na abundância entre os riachos.

No Capítulo 2 evidenciei que além das altas taxas de esporulação dos fungos, a comunidade de hifomicetos também está relacionada com maiores taxas de consumo foliar dos fragmentadores. Também constatei que o carbono C<sub>4</sub> pode ser consumido, em detrimento do carbono C<sub>3</sub>, pelos fragmentadores, embora as plantas C<sub>4</sub> não contribuam na mesma medida que as plantas C<sub>3</sub> para os riachos subtropicais.

O Capítulo 3 partiu dos resultados encontrados nos capítulos 1 e 2, pois sabendo que os atributos foliares são relevantes para os fragmentadores e decompositores, investiguei os efeitos de fatores externos na constituição das folhas. O estudo trouxe dados inéditos ao cruzar os efeitos do enriquecimento de nutrientes nas folhas, com os efeitos do enriquecimento de nutrientes dissolvidos na água, na qualidade do recurso e na decomposição foliar mediada por Hifomicetos. Estes resultados são importantes, pois indicam que o aumento da disponibilidade de nutrientes dissolvidos na água pode exercer um maior controle sobre a atividade microbiana, e conseqüentemente nas taxas de decomposição, do que o

enriquecimento de nutrientes nas folhas. Este estudo foi aplicado em região temperada, porém pode-se esperar os mesmos resultados para regiões tropicais e subtropicais e pode explicar a variabilidade nas taxas de decomposição registrada em todo o mundo.

De maneira geral, os estudos apontam para a importância da atividade dos fragmentadores e fungos decompositores no processamento de material alóctone. Aliado a isto, evidencia que estes organismos estão conectados com a vegetação ripária, e mudanças nestas zonas ripárias podem trazer consequências para as funções nos sistemas aquáticos, como a baixa contribuição de espécies  $C_4$  para a cadeia trófica frente aos avanços de monoculturas no entorno dos riachos.

Estes estudos ainda abrem espaço para novas investigações acerca da decomposição foliar em riachos subtropicais, tendo como foco os organismos fragmentadores e decompositores. Outros estudos que podem complementar os resultados encontrados são: investigar os efeitos dos atributos foliares, especialmente dureza e lignina, no crescimento dos fragmentadores e conseqüentemente nas taxas de consumo foliar destes invertebrados; investigar a dinâmica de populações das larvas de *Phylloicus* em riachos subtropicais para relacioná-la com a dinâmica da matéria orgânica e contribuir para o conhecimento deste grupo; ampliar o uso da técnica de isótopos estáveis, com o intuito de analisar a assimilação de espécies vegetais exóticas por fragmentadores e registrar a efetiva contribuição destas espécies para a cadeia trófica de riachos, com o intuito de projetar os efeitos da substituição de espécies nativas por espécies exóticas nas zonas ripárias; e investigar a atividade alimentar dos fragmentadores frente a folhas geradas de árvores fertilizadas e árvores não fertilizadas, bem como de árvores sob estresse hídrico e de rega regular, com o intuito de compreender o efeito do clima e da natureza geológica das variadas regiões do planeta na qualidade das plantas como fonte de alimento para os consumidores, o que explicaria as diferenças observadas entre sistemas temperados e tropicais, bem como dentro dos trópicos.