

Manual de Fungos Zoospóricos

**Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli
Gustavo Henrique Jerônimo
Ana Lucia de Jesus
Marcela Castilho Boro**



IPA
INSTITUTO DE
PESQUISAS AMBIENTAIS



Governo do Estado de São Paulo

Tarcísio de Freitas — Governador

Secretaria de Estado do Meio Ambiente

Natália Resende — Secretária

Instituto de Pesquisas Ambientais

Marco Aurélio Nalon — Diretor

CORPO EDITORIAL

Organizadora

Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Autores

Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Ana Lúcia de Jesus (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Gustavo Henrique Jerônimo (Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena-PR, Brasil)

Marcela Castilho Boro (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Design da Capa

Elvis José Nunes da Silva (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Produção Editorial

Elvis José Nunes da Silva (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Karina Margaret Silva das Neves (Instituto de Pesquisas Ambientais, Unidade Jardim Botânico, São Paulo-SP, Brasil)

Ficha Catalográfica elaborada pelo Serviço de Bibliotecas, Mapoteca, Museus, Acervos Arquivístico e Iconográfico do Instituto de Pesquisas Ambientais

P665 Pires-Zottarelli, Carmen Lídia Amorim [et al.]

Manual de fungos zoospóricos / Carmen Lídia Amorim Pires-Zottarelli; Gustavo Henrique Jerônimo; Ana Lucia de Jesus.; Marcela Castilho Boro. – São Paulo: SEMIL/IPA, 2025.

15 p.: il.; color.

ISBN: 978-65-83232-07-6

1. Fungos zoósporos. 2. Triagem e identificação dos fungos
3. Extração do DNA genômico. 4. Preservação dos fungos zoospóricos.

CDU 591.341

Bibliotecária Arlete Alves Ferreira CRB-8/7646

1. Introdução

Os fungos zoospóricos são seres microscópicos, considerados cosmopolitas e de crucial importância nos processos de decomposição nos ecossistemas aquáticos (de água doce, salobra ou marinha) e terrestres, onde atuam na estruturação da cadeia alimentar e na transferência de energia. Nestes ecossistemas são frequentemente observados como saprofitos em substratos de origem vegetal e animal e/ou como parasitas de algas, cianobactérias, invertebrados, vertebrados, plantas, fungos e oomicetos (Bills *et al.* 2004, Kagami *et al.* 2004, Shearer *et al.* 2007, Marano *et al.* 2011, Sime-Ngando 2012, James *et al.* 2014, Powell & Letcher 2014a, b, Tedersoo *et al.* 2018, Galindo *et al.* 2021) (figura 1A-D).

Inicialmente classificados em um único filo, Chytridiomycota, os fungos zoospóricos estão atualmente inseridos em oito linhagens parafiléticas, Aphelidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharomycota, Neocallimastigomycota,

Olpidiomycota, Rozellomycota e Sanchytriomycota, suportadas por análises filogenéticas, filogenômicas e dados da ultraestrutura da célula reprodutiva (zoósporo). Os zoósporos, caráter provavelmente retido do ancestral comum do reino dos fungos, produzidos assexuadamente e, sem parede, são responsáveis pela dispersão destes fungos para novos substratos e hospedeiros, sendo sua motilidade dependente da reserva endógena de energia e de água ou umidade (James *et al.* 2006, Hibbett *et al.* 2007, Wijayawardene *et al.* 2024). Quando presentes, os zoósporos possuem um único flagelo, localizado posteriormente (com exceção de representantes de Neocallimastigomycota que podem ter mais de um flagelo), normalmente com uma a várias gotículas lipídicas hialinas, podendo ser incolores, ou coloridas, devido a presença de carotenoides (figura 2A-D).

Esse grupo de fungos contempla espécies com talo relativamente simples, unicelular ou pluricelular, de variadas formas. O talo pode consistir de um único zoosporângio, que quando com rizoides é considerado

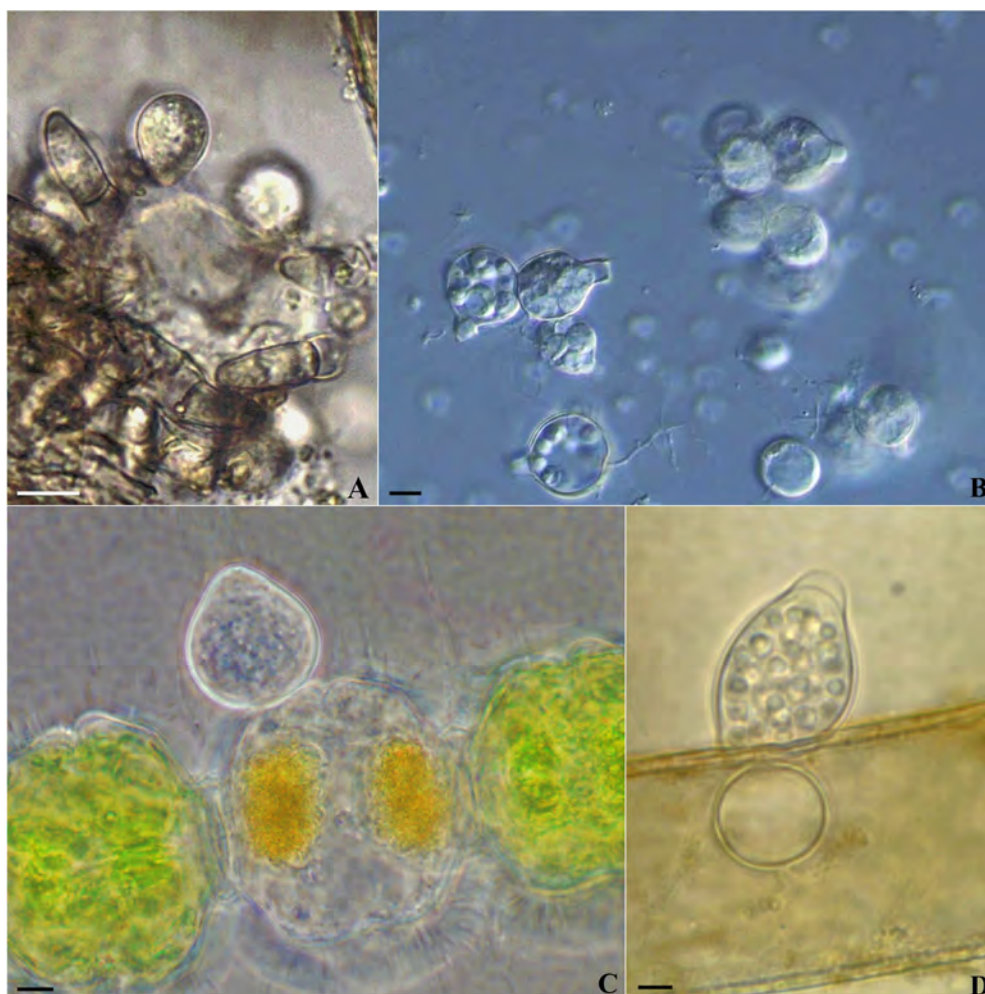


Figura 1. A. *Septosperma rhizophydii* Whiffen ex W.H. Blackw. & M.J. Powell parasitando *Rhizophydium* sp. Zoosporângio piriforme e esporos de resistência. B. Zoosporângios de *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols. Foto cortesia do Dr. Timothy Yong James. C, D. Quitridias parasitando algas dos gêneros *Desmidium* e *Oedogonium*, respectivamente. Fotos cortesia da Dra. Joyce Longcore.

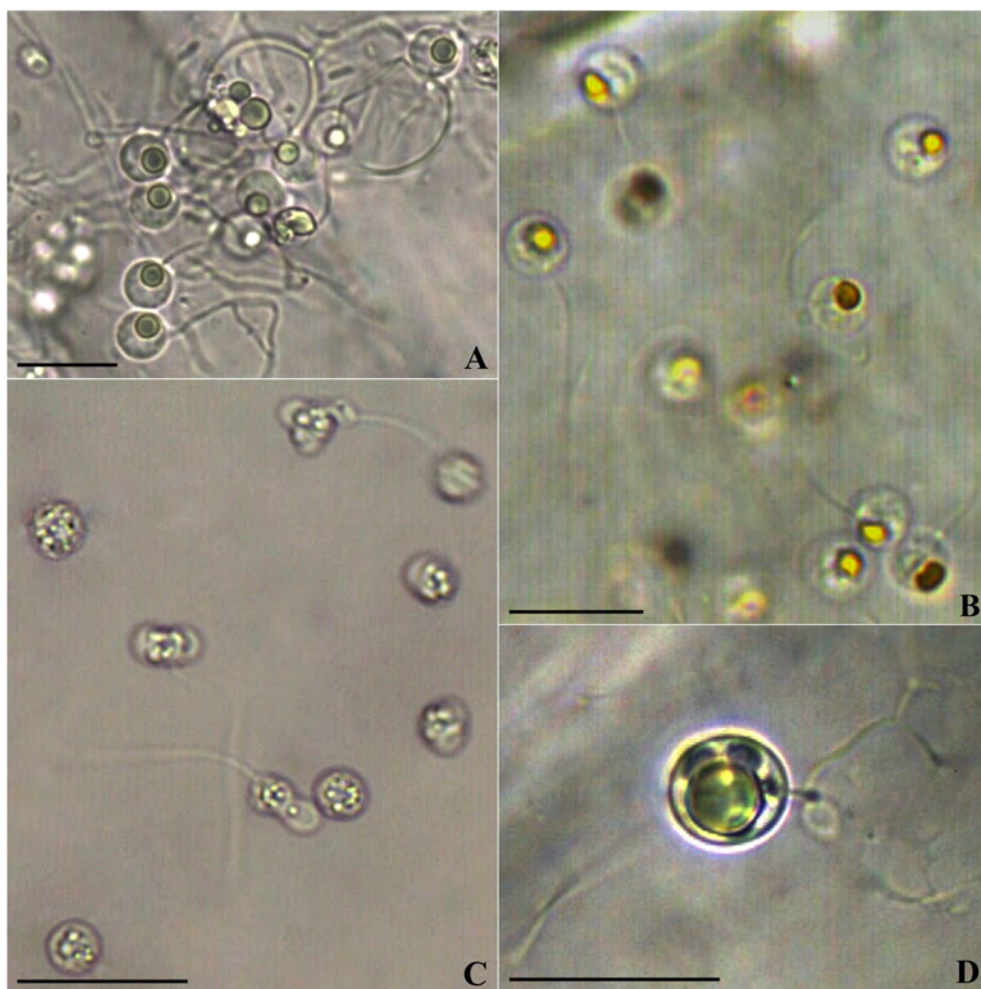


Figura 2. Zoósporos de representantes de Chytridiomycota. A. Zoósporo de *Cladochytrium tenue* Nowak. B. Zoósporo de *Cladochytrium replicatum* Karling. C. Zoósporo de *Karlingiomyces granulatus* (Karling) Sparrow. D. Germinação de zoósporo de *Entophlyctis luteolus* Longcore. Fotos Carmen L.A. Pires-Zottarelli.

eucárpico, monocêntrico (figura 3A, B, C, E e F); e quando sem rizoides, holocárpico, monocêntrico. O talo holocárpico é sempre endobiótico, podendo estar dentro de substrato em decomposição ou hospedeiro; e o eucárpico pode ser endobiótico ou epibiótico. Quando o talo possui vários zoosporângios, estes se unem por meio do rizomicélio (figura 3G, H, L, M, O e P), o qual é um sistema rizoidal anucleado que se assemelha ao micélio e possui diâmetro variável, ramificado e tubular, sendo este talo chamado de eucárpico, policêntrico (figura 3G, H, L, M e P). Os zoosporângios podem ser apofisados ou não, inoperculados ou operculados, lisos ou ornamentados, os quais produzem os zoósporos, que podem ser liberados por meio de deliquescência da parede do zoosporângio, por um ou mais poros, ou um ou mais opérculos (figura 3A-N).

Há também poucas espécies miceliais dentro do grupo, as quais apresentam hifas cenocíticas (Alexopoulos *et al.* 1996, Powell & Letcher 2014a,b). Como exemplo temos *Allomyces arbusculus*, uma espécie pertencente ao filo Blastocladiomycota, que

apresenta alternância de gerações (n e $2n$), com fase esporofítica e gametofítica (figura 4A-G).

As características morfológicas das diferentes espécies de fungos zoospóricos determinarão o modo de isolamento, cultivo e preservação desses fungos.

Nesse manual abordaremos, de maneira geral e simplificada, as técnicas utilizadas para coleta, iscagem, isolamento, purificação, análise molecular e preservação da maioria dos fungos zoospóricos aeróbicos (então excluímos daqui os representantes de Neocallimastigomycota), com especial ênfase aos saprofíticos.

2. Métodos para coleta e iscagem de fungos zoospóricos

As técnicas de coleta a serem utilizadas para os fungos zoospóricos dependerão do grupo a ser estudado. A maioria das espécies parasitas deve ser procurada diretamente em seus hospedeiros, com metodologia apropriada. Aqui serão abordadas as técnicas utilizadas para as espécies saprofíticas aeróbicas, com iscagem em laboratório, e em campo, as quais permitem a iscagem de eventuais parasitas de algas, invertebrados, fungos,

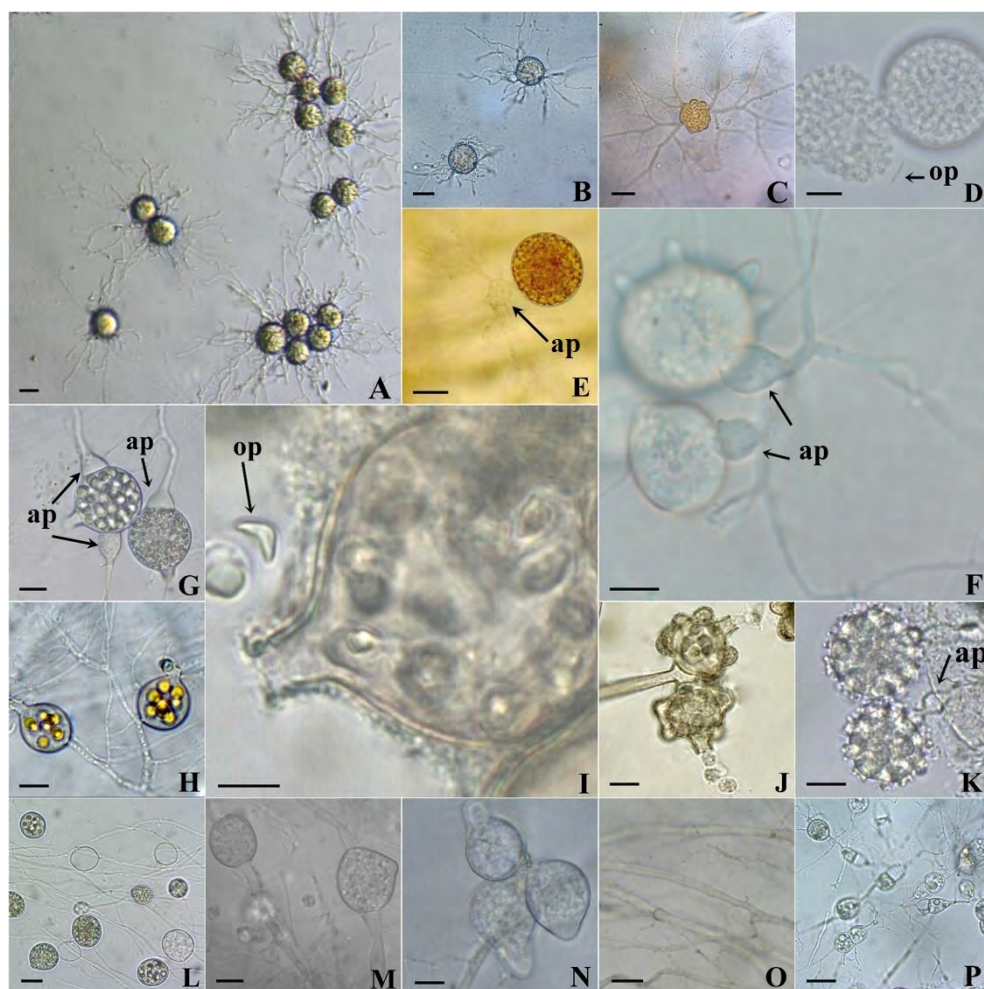


Figura 3. Representantes de Chytridiomycota. A, B. Talo eucárpico, monocêntrico de *Rhizophlyctis rosea* (de Bary & Woronin) A. Fisch. em meio de cultura. Fotos: A.L. Jesus. C. Talo eucárpico, monocêntrico de *Entophlyctis lobata* Willoughby & Townley. Foto: G.H. Jerônimo. D. Liberação de zoósporos em meio de cultura de *Chytrium hyalinus* Karling, evidenciando o opérculo. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. E. Talo eucárpico, monocêntrico de *Chytrium aureus* Karling, evidenciando apófise. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. F. Zoosporângios ornamentados e apofisados de *Asterophlyctis sarcoptoides* H.E. Petersen. Foto: G.H. Jerônimo. G. Talo eucárpico, policêntrico de *Nowakowskiella elegans* (Nowak.) J. Schröt., evidenciando zoosporângios apofisados. Foto: G.H. Jerônimo. H. Talo eucárpico, policêntrico de *Cladochytrium replicatum* Karling. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. I. Zoosporângio de *Nowakowskiella elegans*, evidenciando opérculo após liberação dos zoósporos. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. J. Zoosporângios ornamentados de *Polychytrium aggregatum* Ajello liberando zoósporos. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. K. Zoosporângios ornamentados e apofisados de *Phlyctochytrium aureliae* em substrato. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. L. Rizomicélio de *Cladochytrium tenue* Nowak. com zoosporângios. Foto: G.H. Jerônimo. M. Rizomicélio de *Nowakowskiella multispora* Karling. Foto: C.L.A. Pires-Zottarelli. N, O. *Polychytrium aggregatum* Ajello em meio de cultura. N. Zoosporângios em desenvolvimento. O. Rizomicélio. Fotos: C.L.A. Pires-Zottarelli. P. Rizomicélio de *Cladochytrium replicatum* em meio de cultura. Foto: A.L. Jesus. ap = apófise, op = opérculo.

oomicetos, e outros organismos, que normalmente são também amostrados por estas técnicas.

2.1. Material necessário para estudo dos fungos zoospóricos

2.1.1. Para coleta

- Frascos de vidro ou plástico esterilizados (capacidade 200 mL);
- Sacos de plástico transparente (26 × 13 cm);
- Álcool 70%;
- Caixa térmica;
- Espátula ou colher.

2.1.2. Para plaqueamento, iscagem, isolamento, purificação e identificação

- Placa de Petri (vidro ou plástico) 9 cm diâm.;
- Água destilada esterilizada;
- Pinça;
- Estilete;
- Espátula/colher;
- Iscas (sementes de *Sorghum* spp. previamente fervidas, ecdise de cobra, epiderme de cebola, palha de milho, celofane, exoesqueleto de camarão, pólen de *Pinus* spp., fios de cabelo, preferencialmente loiro de crianças por ser mais fino e claro para visualização em microscópio, e maçã);

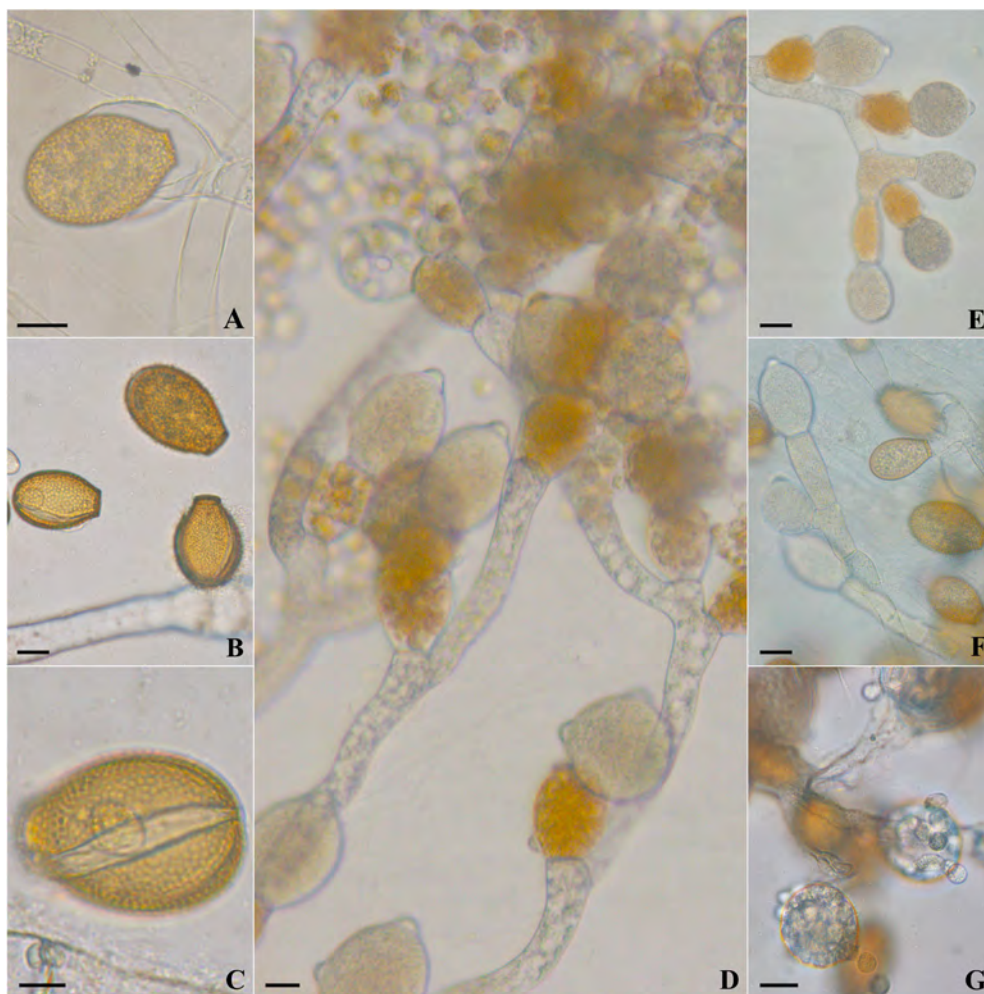


Figura 4. *Allomyces arbusculus* (Blastocladiomycota) - espécie micelial. A, B e C. Meiosporângios (Zoosporângios de resistência). D, E. Gametotalo que produz gametângios femininos (cinzas) e masculinos (alaranjados). F. Esporotalo que produz mitosporângios e meiosporângios. G. Liberação de zoósporos dos mitosporângios. Fotos: C.L.A. Pires-Zottarelli.

- Estufa;
- Microscópio;
- Lupa;
- Béquer 1 L;
- Ingredientes meios de cultura (leite peptonizado, triptona, glicose, ágar, maltose, peptona);
- Antibióticos (sulfato de estreptomicina e penicilina G);
- Balança;
- Banho-maria;
- Autoclave para preparo dos meios de cultura;
- Câmara de fluxo laminar para plaqueamento dos meios de cultura em ambiente estéril;
- BOD - câmara incubadora;
- Água sanitária;
- Álcool 70%;
- 2% solução de hidróxido de potássio (KOH);
- Lâmina (normal e escavada);
- Lamínula;
- Conta gotas;
- Corante (lactofenol com azul de algodão);
- Caneta para escrita em placa;

- Filme plástico para vedação de placas de Petri com meio de cultura após isolamento;
- Pipeta automática 10-100 µL.

2.1.3. Para preservação

- Erlenmeyer (preparação de meios de cultura);
- Gaze e algodão (para fazer tampões para vidros Erlenmeyer);
- Papel alumínio;
- Placa de Petri (vidro ou plástico) 9 cm diâm.;
- Tubo de vidro;
- Frasco tipo ampola (método Castellani);
- Tampas de borracha butílica (para frascos tipo ampola);
- Frascos Wheaton;
- Parafilm ou Plástico Filme PVC transparente para vedar frascos e placas de Petri;
- Ferramentas: agulhas de inoculação, cortador/furador, pinças;
- Óleo mineral;
- Lâmina;
- Lamínula;

- Corante (lactofenol com azul de algodão);
- Meios de cultura (sólido e líquido) - ingredientes citados acima;
- Antibióticos (citados acima);
- Iscas (sementes de *Sorghum* spp);
- Água destilada esterilizada;
- Balança analítica;
- Autoclave (para esterilização de materiais, vidraria e meios de cultura);
- Câmara de fluxo laminar, equipada com bico de Bunsen, lamparina ou esterilizador infravermelho, utilizados para a esterilização de ferramentas no momento da transferência e inoculação dos fungos;
- Lâmpada germicida (UV) (para esterilização da câmara de fluxo laminar);
- BOD - câmara incubadora;
- Refrigeradores (para conservação de meios de culturas e materiais esterilizados).

2.2. Técnica de iscagem de fungos zoospóricos de amostras de água e solo em laboratório

A técnica consiste na coleta de amostras de água e solo, e a iscagem dos fungos zoospóricos em laboratório, por meio da utilização de substratos

celulósicos, quitinosos e queratinosos (sementes de *Sorghum* spp. previamente fervidas, ecdise de cobra, epiderme de cebola, palha de milho, celofane, exoesqueleto de camarão, pólen de *Pinus* spp. e fios de cabelo) denominados “iscas” (figura 5A), cujo preparo será abordado em tópico separado. Nas sementes a ocorrência dos fungos zoospóricos é mais escassa, ocorrendo normalmente representantes de oomicetos, os quais já foram tratados como fungos zoospóricos no passado, e que hoje pertencem a outro reino.

2.2.1. Amostragem de água

As amostras de água devem ser coletadas em frascos esterilizados (vidro ou plástico) de boca larga com capacidade de até 200 mL. Juntamente com a água, devem ser recolhidos gravetos, folhas, exúvia de insetos, algas, entre outros substratos orgânicos encontrados submersos. As amostras devem ser transportadas até o laboratório em caixas térmicas para evitar o aumento de temperatura.

2.2.2. Amostragem de solo

As amostras de solo devem ser coletadas com o auxílio de uma espátula ou colher, esterilizando com álcool 70% a cada amostragem, as quais devem ser



Figura 5. A. Iscas utilizadas no processo de iscagem múltipla. B. Placa de Petri contendo água, detritos orgânicos e iscas adicionadas. C. Placa de Petri contendo solo, água e iscas adicionadas. Fotos: Ana Lucia de Jesus.

colocadas em sacos plásticos. As amostras devem ser transportadas para o laboratório em caixas térmicas para evitar o aumento de temperatura.

2.2.3. Plaqueamento e iscagem das amostras em laboratório

Alíquotas das amostras, normalmente 30 mL de água, e 15 g de solo (diluído em 30 mL de água destilada esterilizada), são colocadas em placas de Petri, juntamente com os substratos orgânicos coletados, bem como as iscas preparadas no laboratório (vide tópico 2.2.4) (figura 5B-C). Essas iscas são adicionadas às amostras, em temperatura ambiente, e incubadas por 5 dias, quando se iniciará a sua observação quanto à presença de estruturas de fungos zoospóricos. Com exceção dos grãos de pólen, fios de cabelo e sementes de *Sorghum* sp., as demais iscas são padronizadas em fragmentos de 0,6 cm de diâmetro, sendo utilizados dois fragmentos de cada isca por amostra. Outros detalhes da metodologia podem ser consultados em Milanez (1989).

2.2.4. Preparo dos substratos ("Iscas")

As iscas mais comumente utilizadas são: celofane, ecdise de cobra, epiderme de cebola, exoesqueleto de camarão, grão de pólen, palha de milho, sementes de *Sorghum* spp. e fio de cabelo.

Celofane e ecdise de cobra: cortar em pequenos círculos, de diâmetro desejado (normalmente 0,6 cm diâm.), mergulhar no álcool 70%, secar e deixar sob luz ultravioleta por aproximadamente 2 horas.

Epiderme de cebola: retirar a epiderme interna da cebola. Lavar cuidadosamente com água esterilizada, colocar em papel filtro e deixar secar. Cortar em pequenos círculos (normalmente 0,6 cm diâm.) e deixar sob luz ultravioleta por aproximadamente 2 horas.

Exoesqueleto de camarão: selecionar as partes mais transparentes do exoesqueleto e mergulhar em solução de HCl a 1% para descalcificação por uma semana, trocando diariamente a solução. Retirar o material e lavar em água esterilizada várias vezes. Mergulhar em solução de KOH 2% por 10 dias para retirar todo material proteico e outros materiais orgânicos, com exceção da quitina. Ferver uma vez, por três dias em álcool etílico (em banho-maria) para retirada dos pigmentos, se começar a ficar muito quebradiça, ferver por menos dias. Lavar, secar, cortar em círculos (normalmente 0,6 cm diâm.) e deixar sob luz ultravioleta por aproximadamente 2 horas.

Palha de Milho: colocar a palha em água sanitária (teor de cloro ativo de 2,0 e 2,5% p/p). até a descoloração completa. Lavar em água esterilizada

até retirar completamente o hipoclorito. Secar, cortar em pequenos círculos (normalmente 0,6 cm diâm.) e deixar sob luz ultravioleta por aproximadamente 2 horas.

Semente: as sementes normalmente utilizadas são as de *Sorghum* spp. Ferver as sementes por aproximadamente 1 minuto, para a perda do poder germinativo. Logo após, secá-las em estufa a 25 °C, deixando em seguida sob luz ultravioleta por aproximadamente 2 horas.

Grãos de pólen: os grãos de pólen normalmente utilizados são os de *Pinus* spp. Deixe-os bem sequinhos e sob luz ultravioleta por aproximadamente 2 horas.

Fios de cabelo: os fios de cabelo normalmente utilizados são os loiros, pois são claros. Os de criança são os mais indicados, pois são bem finos, o que facilita a observação das estruturas dos fungos.

2.3. Técnica de iscagem de fungos zoospóricos em campo

Nem todos os fungos zoospóricos crescem nas iscas utilizadas em laboratório, sendo indicada a iscagem em campo para a captura de outros grupos de fungos saprofíticos. Para isto, frutos são indicados como iscas, sendo normalmente utilizado fruto de *Malus* sp. (maçã). Estes frutos são colocados em potes plásticos de polipropileno perfurados (para permitir a entrada de água), amarrados com fio de náilon e imersos em corpos d'água doce por aproximadamente 20 a 30 dias. Após este período, os frutos são coletados e transportados para o laboratório numa caixa térmica (figura 6A-B). Deve-se tomar cuidado com a curiosidade popular, a qual, por muitas vezes, inviabiliza essa técnica.

3. Triagem e identificação dos fungos zoospóricos

Como comentado acima, após aproximadamente 5 dias, as iscas das amostras de água e solo devem começar a ser observadas com o auxílio do microscópio óptico. Para isso, são montadas lâminas com cada um dos substratos com 1 gota de água destilada esterilizada e lamínula. Para as sementes utilizamos vidro relógio, onde colocamos as sementes já colonizadas com um pouco de água destilada esterilizada e levamos diretamente no microscópio (aconselha-se tirar o "charriot" do microscópio para facilitar). Inicialmente as iscas devem ser analisadas na objetiva de 10 ×, e após a detecção de estruturas de fungos zoospóricos, essas devem ser observadas utilizando-se a objetiva de 40 ×, visando a identificação dos táxons, pelo menos em nível genérico. Se observados estruturas de fungos



Figura 6. A. Fruto de *Malus* sp. (maçã) em recipientes de plástico perfurado. B. Recipiente mergulhado em corpo d'água. C. Frutos colocados em béqueres (1 L), com água esterilizada, sob aeração constante utilizando bombas de aquário. D. Pústulas formadas em maçã. Fotos: Ana Lucia de Jesus.

zoospóricos, as iscas originais devem ser separadas e colocadas em outras placas com novos substratos, a fim de permitir crescimento e melhor visualização dos espécimes, bem como eliminar ou diminuir a presença de outros fungos e/ou bactérias, antes que se proceda sua purificação. Normalmente se tem mais de um táxon de fungo zoospórico em cada tipo de isca, o que torna um pouco trabalhoso a separação de cada um dos táxons.

Para os fungos zoospóricos iscados em campo, após o período especificado acima, os frutos são lavados e colocados em béqueres (1 L), com água esterilizada autoclavada, sob aeração constante, utilizando bombas de aquário, em laboratório. As pústulas (colônias de vários fungos), geralmente esbranquiçadas, presentes na superfície da maçã, são dissecadas com auxílio de estilete, sob lupa, e é dado prosseguimento para o isolamento dos táxons (figura 6C-D). Essa técnica é bastante interessante para representantes de *Blastocladiomycota* e *Monoblepharomycota*, especialmente para os gêneros *Blastocladia* e *Gonapodya*, respectivamente, os quais

normalmente não são obtidos por meio da primeira técnica. No entanto, são fungos de difícil cultivo, e como comentado acima, vários táxons aparecem juntos, o que dificulta um pouco seu isolamento.

Detalhes morfológicos para a identificação dos espécimes de fungos zoospóricos isolados pelas diferentes técnicas pode ser consultado nos trabalhos monográficos de Sparrow (1960) e Karling (1977), bem como em descrições originais.

4. Isolamento e purificação dos fungos zoospóricos

O isolamento e purificação dos táxons de fungos zoospóricos pode ser realizado basicamente de duas maneiras. A primeira consiste na simples adição dos substratos (iscas) colonizados pelo táxon em um meio de cultura com antibióticos. Recomenda-se, que antes de ser adicionado na placa final, o substrato seja arrastado em outra placa contendo meio de cultura com antibióticos, a fim de minimizar o crescimento bacteriano. No entanto, normalmente há vários táxons

de fungos crescendo em um mesmo substrato, com espécimes monocêntricas, policêntricas e miceliais (figura 7A-F), o que dificulta o seu isolamento e purificação. Uma segunda maneira é por meio da captura de zoósporos no momento da liberação dos mesmos. Para isto, os substratos são colocados em lâminas escavadas contendo água destilada autoclavada. Assim que a liberação dos zoósporos for observada e estes estiverem "nadando" na gotícula de água, os mesmos são capturados com auxílio de uma pipeta automática e inseridos em meio de cultura (figura 8A-C), como o PmTG (0,4 g/L de leite peptonizado, 0,4 g/L de triptona, 2,5 g/L de glicose e 10 g/L de ágar) (Longcore 1995), normalmente utilizado para espécies monocêntricas e policêntricas e/ou MP₅ (4 g/L de maltose, 1 g/L de peptona, 15 g/L de ágar) (Beneke & Rogers 1962), com adição de 0,1g/L de sulfato de estreptomicina e 0,1 g/L de penicilina G, normalmente utilizado para espécies miceliais. Nesse caso, repiques são feitos até obtenção de cultura pura (figura 8D-F).

5. Extração, amplificação e purificação de rDNA

As análises moleculares têm revolucionado a forma como entendemos a sistemática dos fungos zoospóricos. Embora atualmente estejamos na era da filogenômica, as análises gênicas, especialmente 18S (SSU), ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2) e 28S (LSU) ainda são muito importantes e úteis para o delineamento de espécies e reconstrução de filogenias com diversos propósitos. O primeiro passo para a realização das análises moleculares é a obtenção de culturas puras como mencionado no tópico anterior. Após esse processo desafiador, deve-se, para início dos estudos moleculares, transferir pequenos fragmentos de biomassa fúngica do meio sólido para tubos Falcon de

50 mL de capacidade, contendo 25 mL de meio líquido para permitir o crescimento e produção de biomassa suficiente para a extração do DNA genômico. O tempo necessário para obtenção de suficiente biomassa depende da espécie, mas o processo geralmente leva em torno de 15 dias, podendo os tubos Falcon (meio líquido + fragmentos fúngicos) serem mantidos estacionários ou em agitação. O crescimento da biomassa fúngica em meio líquido deve ser realizada, pois tentativas de extração do DNA diretamente do meio sólido são, na grande maioria dos casos, não efetivas devido a presença do ágar aderido a biomassa fúngica.

5.1. Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA dos fungos zoospóricos pode-se utilizar "kits" de extração (diversas marcas disponíveis) ou o protocolo CTAB 2 ×, sem uso de fenol (James *et al* 2008), o qual é tão efetivo quanto os "kits" e convenientemente mais barato. Abaixo será resumido o protocolo para facilitar a aplicação cotidiana nas práticas laboratoriais:

Após o crescimento de biomassa em meio líquido (aproximadamente de 10 a 15 dias em temperatura ambiente), essa biomassa é transferida, com auxílio de uma micropipeta, para microtubos de 2 mL. Inicialmente, serão adicionados 250 µL de tampão de extração CTAB 2 × a cada amostra (para preparação do CTAB 2 × consultar <https://sites.lsa.umich.edu/mycology/protocols/>). Use um pistilo e macere a amostra, dentro do microtubo, por pelo menos 5 minutos (idealmente entre 7 a 10 minutos por amostra). Na sequência, adicione mais 250 µL de tampão de extração CTAB 2 × a cada amostra e misture em vórtex. Após essas etapas, incube as amostras a 65 °C por 60 minutos em banho-maria ou incubadora. Esse processo ajudará a extrair e hidratar os ácidos nucleicos (misture pelo menos uma vez em vórtice durante o período de incubação). A próxima

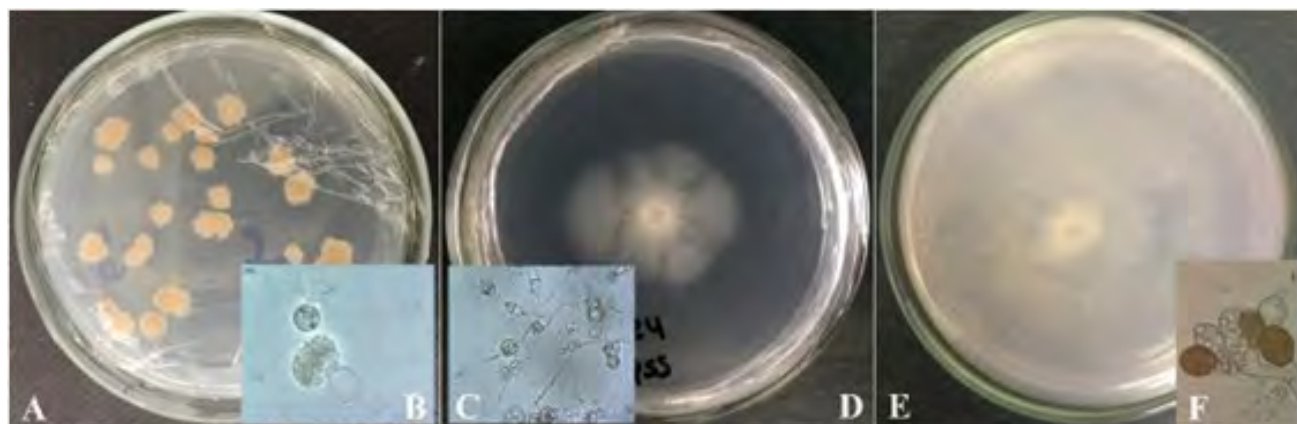


Figura 7. A-F. Cultivo em meio de cultura. A. Crescimento de espécime monocêntrica. B. *Rhizoclostridium globosum*. C. Crescimento de espécime policêntrica. D. *Cladochytrium replicatum*. E. Crescimento de espécime micelial. F. *Allomyces arbusculus*. Fotos: Ana Lucia de Jesus.

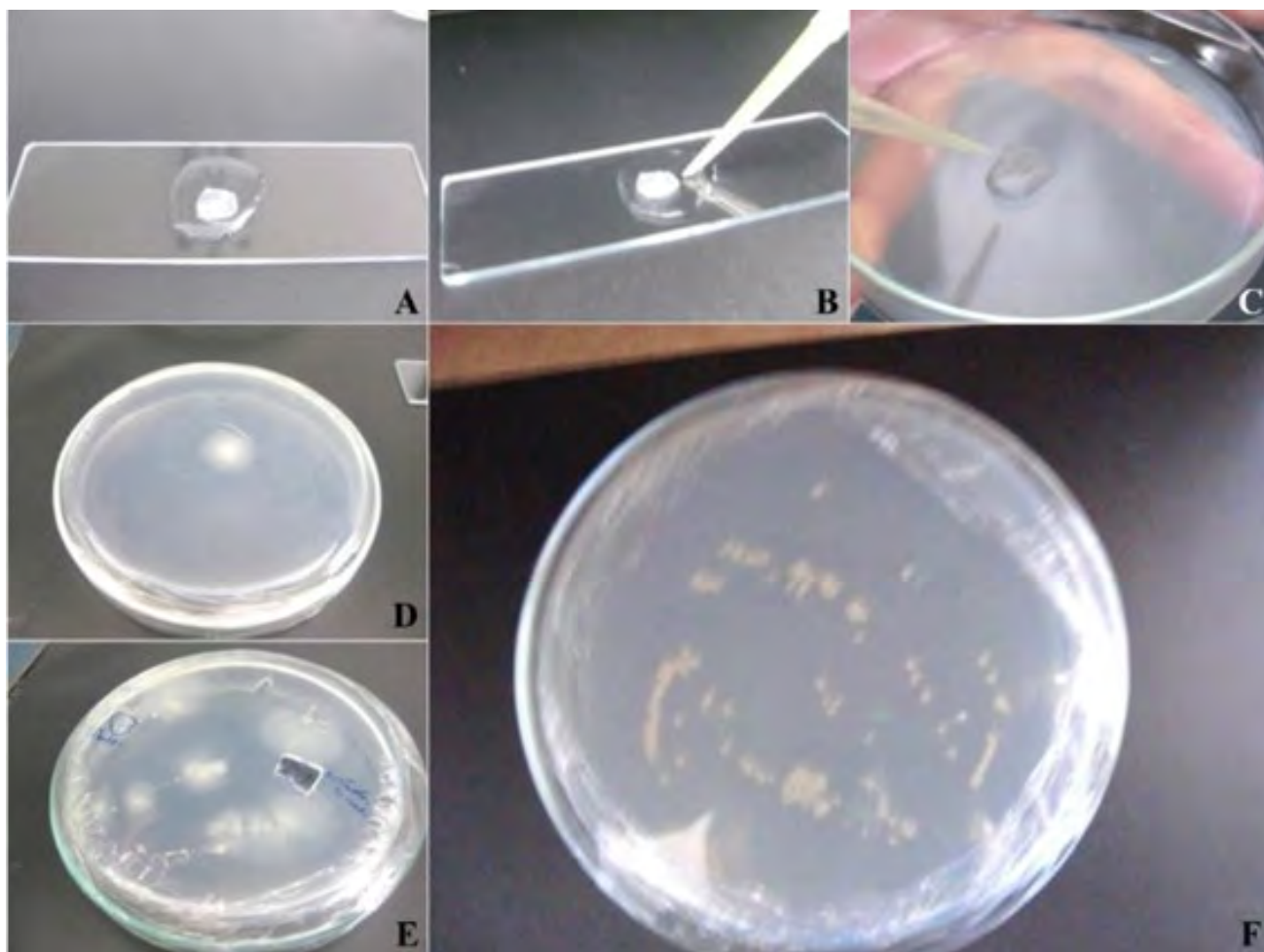


Figura 8. Cultivo de fungos zoospóricos através da captura de zoósporos. A. Observação da liberação de zoósporos em água através de microscópio óptico. B. Captura de zoósporos com auxílio de pipeta. C. Inoculação dos zoósporos em meio de cultura. D-E. Observação do crescimento do fungo e remoção de possíveis contaminantes. F. Cultura purificada. Fotos: Gustavo Henrique Jerônimo.

etapa será a adição de 500 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico às amostras. Tampe bem e agite vigorosamente para formar uma emulsão. A seguir os microtubos são colocados em uma microcentrífuga por 12 minutos a 13.000 rpm (rotações por minuto), ou por tempo suficiente para produzir um sobrenadante claro. Com o auxílio de uma micropipeta, remova cuidadosamente a camada aquosa superior e a transfira para um microtubo limpo e etiquetado (evite absorver qualquer material da interface). Descarte o conteúdo do tubo antigo como lixo orgânico em um balde de lixo (não o coloque na pia). A adição de 50 μ L de RNase ao conteúdo aquoso de cada tubo e posterior incubação a 37 °C por 30 minutos é uma etapa opcional, mas altamente recomendável para se obter um DNA de melhor qualidade. A próxima etapa será uma segunda adição clorofórmio: álcool isoamílico (volume igual ao presente na amostra), só que desta vez, haverá menos material emulsionado. Colete a fração aquosa superior como antes por centrifugação (se DNA extralimpo for desejado, repita a etapa de extração uma terceira e até quarta vez, até que nenhum material de interface permaneça e a porção aquosa

esteja boa e clara). Em qualquer caso, tenha cuidado para evitar qualquer material proteico da interface após sua extração final (é sempre melhor deixar um pouco da interface para trás, se necessário, para evitar contaminação de proteínas).

O próximo passo, será estimar o volume de sua amostra de DNA e adicionar 2/3 do volume de álcool isopropílico gelado, tampar e misturar por inversão. Será possível observar um precipitado branco e fibroso (DNA e polissacarídeos quando presentes). Coloque as amostras no congelador durante a noite ou por pelo menos 2 horas, e colete o precipitado após o período determinado por centrifugação a 13.000 rpm por 7 minutos. Para isso, despeje o sobrenadante de álcool, use uma centrífuga de bancada por 30 segundos, e em seguida, remova o restante do álcool usando uma pipeta. Adicione, então, 1 mL de etanol frio (EtOH) 70% a cada tubo e agite suavemente, e em seguida, os coloque em microcentrífuga por 2 minutos a 13.000 rpm. A seguir, despeje o sobrenadante de álcool etílico, e centrifugue os tubos por 30 segundos em uma centrífuga de bancada e remova o restante do líquido usando uma pipeta.

Seque a amostra completamente na capela de fluxo laminar e ressuspenda o pellet de DNA em 50 µL de TE (tampão Tris-EDTA) ou em água ultrapura livre de nucleotídeos. O material pode ser armazenado em congelador a -20 °C ou idealmente em ultrafreezer a -80 °C por longos períodos. A qualidade das amostras de DNA pode ser verificada adicionando-se 2 µL em um gel de agarose a 0,8%. Boas extrações de DNA são caracterizadas pela presença de uma banda distinta de DNA de alto peso molecular com pouca ou nenhuma evidência de produtos de degradação de menor peso molecular (figura 9).

5.2. Amplificação

Para a amplificação do DNA dos fungos zoospóricos geralmente utilizamos o protocolo descrito no kit "PCR Supermix" (Invitrogen®), que consiste na preparação de uma solução final de 25 µL, dos quais 12,5 µL são de PCR master mix (DNA polimerase, dNTPs, solução tampão, dentre outros), 10 µL de água ultrapura, 1 µL de DNA, 0,75 µL de

"primer forward" e 0,75 µL de "primer reverse". As regiões gênicas mais comumente utilizadas são 18S (SSU), ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2) e 28S (LSU), as quais podem ser eficientemente amplificadas com os pares de "primers" NS4/SR1R (White *et al* 1990), ITS4/ITS5 (White *et al* 1990) e LR0R/LR5 (Vilgalys 2013), respectivamente. De acordo com James *et al* (2006), os parâmetros citados a seguir podem ser utilizados de maneira eficiente para amplificar as três regiões citadas acima: 94 °C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 5 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. A eficiência da amplificação pode ser observada em gel de agarose a 1%, sendo que amplificações de boa qualidade formam uma banda única.

5.3. Purificação

Após a observação da amplificação em gel de agarose a 1%, deve-se, para as amplificadas, realizar a purificação da amostra. O processo de purificação visa

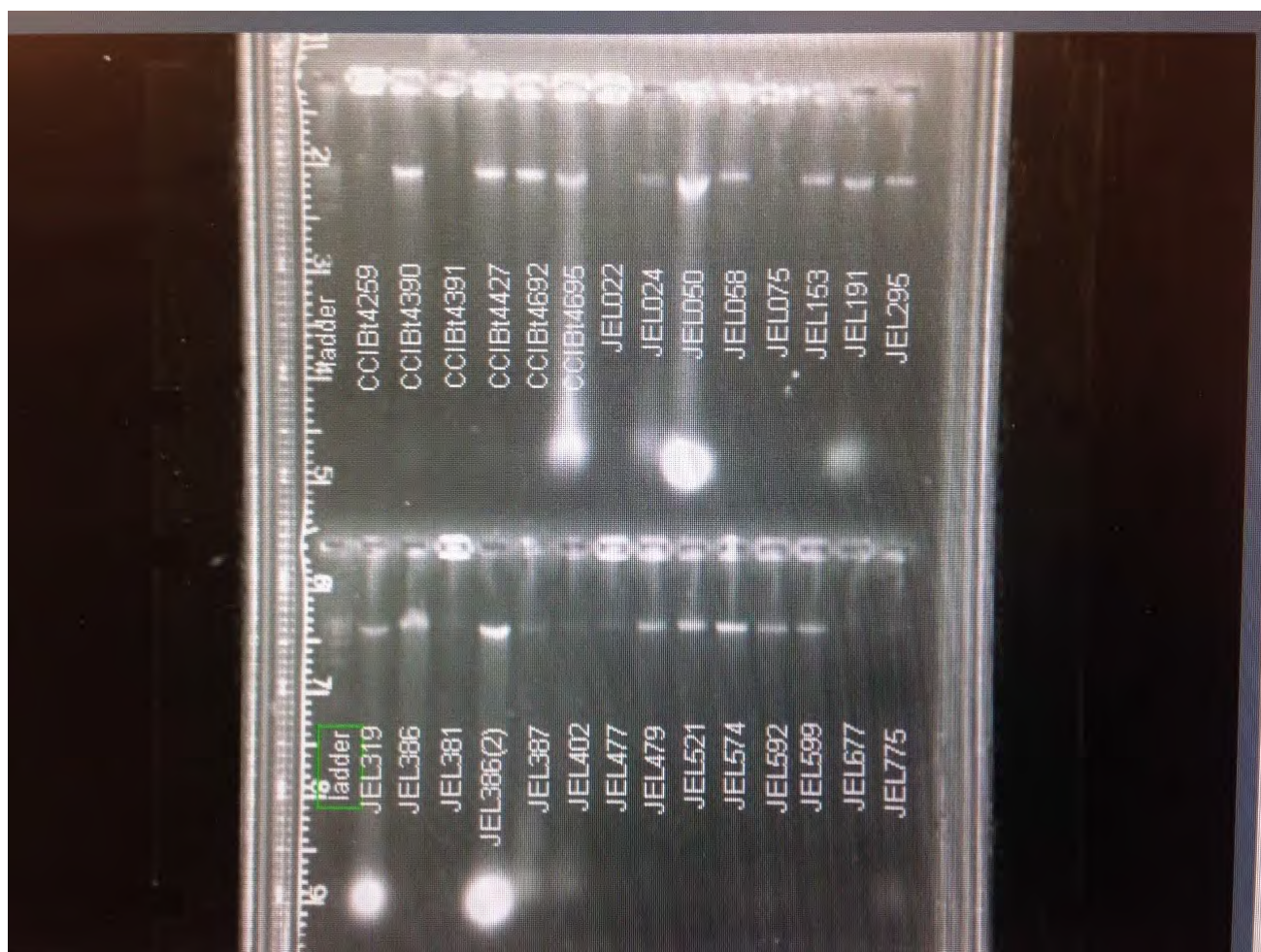


Figura 9. Gel de agarose de extração de DNA genômico. Os isolados que possuem bandas distintas e sem nenhuma evidência de produto de degradação (CCIBt4390, CCIBt4427, CCIBt4692, por exemplo), representam extrações de boa qualidade. As extrações para as quais não são observadas bandas visíveis (CCIBt4259, CCIBt4391, por exemplo) ou aquelas que apresentaram baixo contraste (JEL381, JEL402, por exemplo), falharam ou apresentam baixas concentrações de DNA e idealmente devem ser repetidas. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica.

remover todos os resquícios de reagentes utilizados durante a etapa de amplificação ("primers, DNA polimerase, dNTPs, dentre outros). Essa etapa pode ser realizada com "kits" de purificação, seguindo as recomendações do fabricante ou por meio da utilização da enzima ExoSAP. Destacaremos a seguir o procedimento de purificação com a enzima ExoSAP, já que a metodologia utilizada nos "kits" pode ser consultada nos respectivos manuais que acompanham o produto (por exemplo, o "kit" AxyPrep PCR Clean-up -Axygen®).

O processo de purificação com a enzima ExoSAP funciona de forma eficiente para DNA fita simples. Ela não pode digerir dímero de "primer", e por isso, se o seu produto de PCR apresentar dímero de "primer" no gel, recomenda-se a utilização de "kits" com colunas para purificação. No entanto, a purificação com essa enzima tem como benefícios o preço (mais barato), praticidade (mais fácil), além de não causar perda de amostra, quando comparado aos métodos de purificação com "kits". A seguir será sumarizado o protocolo para praticidade laboratorial: Inicialmente dilua a solução estoque de ExoSAP na proporção 1:11 (solução de trabalho), ou seja, pegue 10 µL da solução estoque e adicione 100 µL de água livre de nucleotídeos. Mantenha em freezer a -20 °C para armazenamento. Para utilização, remova a solução de trabalho de ExoSAP do freezer, descongele e mantenha no gelo durante todo o procedimento a seguir. A seguir, misture 5 µL do produto de PCR com 2 µL de ExoSAP diluído em tubos de PCR de 0,2 mL. Se você obtiver um produto de PCR fraco, aumente os volumes proporcionalmente. Você não precisa limpar todo o produto de PCR. A seguir, incube a mistura em termociclador e configure a máquina da seguinte forma: 37 °C por 30 min para permitir que a enzima funcione, 80 °C por 15 min para desnaturar a enzima e uma etapa final de 10 °C até você tirar o tubo da máquina. Por fim, dilua a mistura para a concentração padrão com água livre de nucleotídeos e o produto final estará pronto para sequenciamento.

6. Preservação dos fungos zoospóricos

Para a preservação das estruturas fúngicas observadas são preparadas lâminas semipermanentes com lactofenol e azul de algodão, uma vez que a obtenção de culturas puras nem sempre é possível. Essas lâminas são posteriormente depositadas em herbários. Quando há a obtenção de culturas puras, estas podem ser preservadas por meio de diferentes métodos (descritos abaixo).

6.1. Preservação de fungos zoospóricos em água destilada estéril ou método Castellani

O método consiste na transferência de pequenos discos ou pedaços de meio de cultura contendo

estruturas do fungo para água destilada esterilizada contida em frasco tipo ampola (figura 10). A estocagem pode ser feita em temperatura ambiente ou câmara fria. A repicagem dos fungos zoospóricos preservados por este método deve ser feita dentro de 6 meses a 1 ano. Para reativação, basta transferir os discos diretamente para meio de cultura apropriado. Para evitar contaminações e desperdício de reagentes, meios de cultura, tempo e mão de obra, todos os procedimentos microbiológicos aqui descritos são conduzidos em condições máxima de assepsia. Lembramos que todo material utilizado deve ser esterilizado previamente.

6.1.1. Preparação dos frascos

- Colocar cerca de 5 mL de água destilada no frasco tipo ampola, tampar com papel alumínio;
- Esterilizar os frascos juntamente com a água e suas tampas de borracha, separadamente, em autoclave a 121 °C por 15 minutos;
- Aguardar que esfrie e, se necessário, estocar em geladeira por até 30 dias.

6.1.2. Preparação do fungo

- Inocular os fungos em placas de Petri com o meio de cultura apropriado;
- Incubar em câmara climática BOD a aproximadamente 25 °C até o crescimento.

6.1.3. Técnica

- Em câmara de fluxo laminar, em condições de máxima assepsia e com instrumentos esterilizados, adicionar aproximadamente 5 pequenos discos ou pedaços das colônias fúngicas nos frascos contendo água destilada esterilizada;
- Vedar os frascos com as tampas de borracha esterilizadas e com plástico filme de PVC transparente em volta da tampa;
- Fazer triplicata de cada isolado;
- Armazenar os frascos, preferencialmente, em câmara fria (em torno de 17 a 18 °C).

6.2. Preservação dos fungos zoopóricos em tubos de ensaio com meio de cultura

É o método mais simples, que consiste em transferir constantemente o fungo para meios de cultura apropriado. São utilizados tubos de ensaio com meio de cultura inclinado (figura 10). A periodicidade de repicagem é variável, sendo de 3 a 12 meses, quando estocados em câmara fria.

6.2.1. Preparação dos tubos

- Preparar o meio de cultura indicado para o isolado (vide tópico 4) e, antes de esterilizar, homogeneizar e fundir o meio através

de aquecimento em micro-ondas por aproximadamente 3 minutos, pausando com frequência para agitar;

- Distribuir o meio de cultura em tubos de ensaio, enchendo com aproximadamente 3 cm de meio e fechar os tubos com tampa de polietileno própria;
- Esterilizar os tubos, juntamente com o meio de cultura e suas tampas, em autoclave a 121 °C por 15 minutos;
- Após retirar da autoclave, manter os tubos inclinados até a solidificação. Se necessário estocar em geladeira por até 30 dias.

6.2.2. Preparação do fungo

- Inocular os fungos em placas de Petri com o meio de cultura apropriado;
- Incubar em câmara climática BOD a aproximadamente 25 °C até o crescimento.

6.2.3. Técnica

- Em câmara de fluxo laminar, em condições de máxima assepsia e com instrumentos esterilizados, adicionar um disco ou pedaço da colônia fúngica no tubo contendo o meio de cultura inclinado, tampar, vedar com plástico filme de PVC transparente e incubar em câmara climática BOD a aproximadamente 25 °C até seu crescimento;
- Fazer triplicata de cada isolado;
- Após crescimento, armazenar os frascos, preferencialmente, em câmara fria (em torno de 17 ou 18 °C).

6.3. Preservação de fungos zoospóricos em meio de cultura líquido

O método também é simples e consiste na transferência de "raspagem" do fungo ou pequenos pedaços de meio de cultura contendo estruturas do fungo para meio de cultura líquido em frasco tipo ampola (figura 10). A estocagem deve ser feita, preferencialmente, em câmara fria. Para reativação do microrganismo, transfere-se uma pequena quantidade do meio líquido contendo o isolado para placas de Petri com meio de cultura sólido apropriado.

6.3.1. Preparação dos frascos

- Preparar o meio de cultura líquido indicado para o isolado (vide tópico 4);
- Distribuir o meio de cultura em frascos tipo ampola, enchendo aproximadamente dois terços do frasco, e tampar com papel alumínio;
- Esterilizar os frascos juntamente com o meio de cultura, e suas tampas de borracha separadamente, em autoclave a 121 °C por 15 minutos;

- Aguardar que esfrie e, se necessário, estocar em geladeira por até 30 dias.

6.3.2. Preparação do fungo

- Inocular os fungos em placas de Petri com o meio de cultura apropriado;
- Incubar em câmara climática BOD a aproximadamente 25 °C até o crescimento.

6.3.3. Técnica

- Em câmara de fluxo laminar, em condições de máxima assepsia e com instrumentos esterilizados, "raspar" o fungo crescido em placa de Petri, com o auxílio de uma alça de inoculação, e colocar nos frascos contendo meio líquido esterilizado;
- Vedar os frascos com as tampas de borracha esterilizadas e com plástico filme de PVC transparente em volta da tampa;
- Fazer triplicata de cada isolado;
- Armazenar os frascos, preferencialmente, em câmara fria (em torno de 17 a 18 °C).

6.4. Preservação de fungos zoospóricos em frascos Wheaton

O método é usado somente para os fungos zoospóricos que crescem em sementes de sorgo (*Sorghum* spp), como isolados do gênero *Allomyces*, citado anteriormente (figura 10). Discos ou blocos de meio de cultura são transferidos para frasco Wheaton (pode ser qualquer outro tipo de frasco) contendo metades de sementes de sorgo esterilizadas e água destilada esterilizada. Não se deve vedar totalmente o frasco, pois há a necessidade de troca de ar do organismo com o ambiente, utilizando para isso tampa com pequenas perfurações. Espera-se o desenvolvimento das colônias nas sementes e armazena-se preferencialmente em câmara fria (em torno de 17 a 18 °C). As culturas permanecem viáveis por aproximadamente seis meses, havendo necessidade de atenção para o repique frequente.

6.4.1. Preparação dos frascos

- Encher os frascos Wheaton (100 mL) com aproximadamente metade de água destilada, tampar com papel alumínio e esterilizar, em autoclave a 121° C por 15 minutos;
- Aguardar que esfrie e, se necessário estocar em geladeira por até 30 dias.

6.4.2. Preparação do fungo

- Inocular os fungos em placas de Petri com o meio de cultura apropriado;
- Incubar em câmara climática BOD a aproximadamente 25 °C até o crescimento;

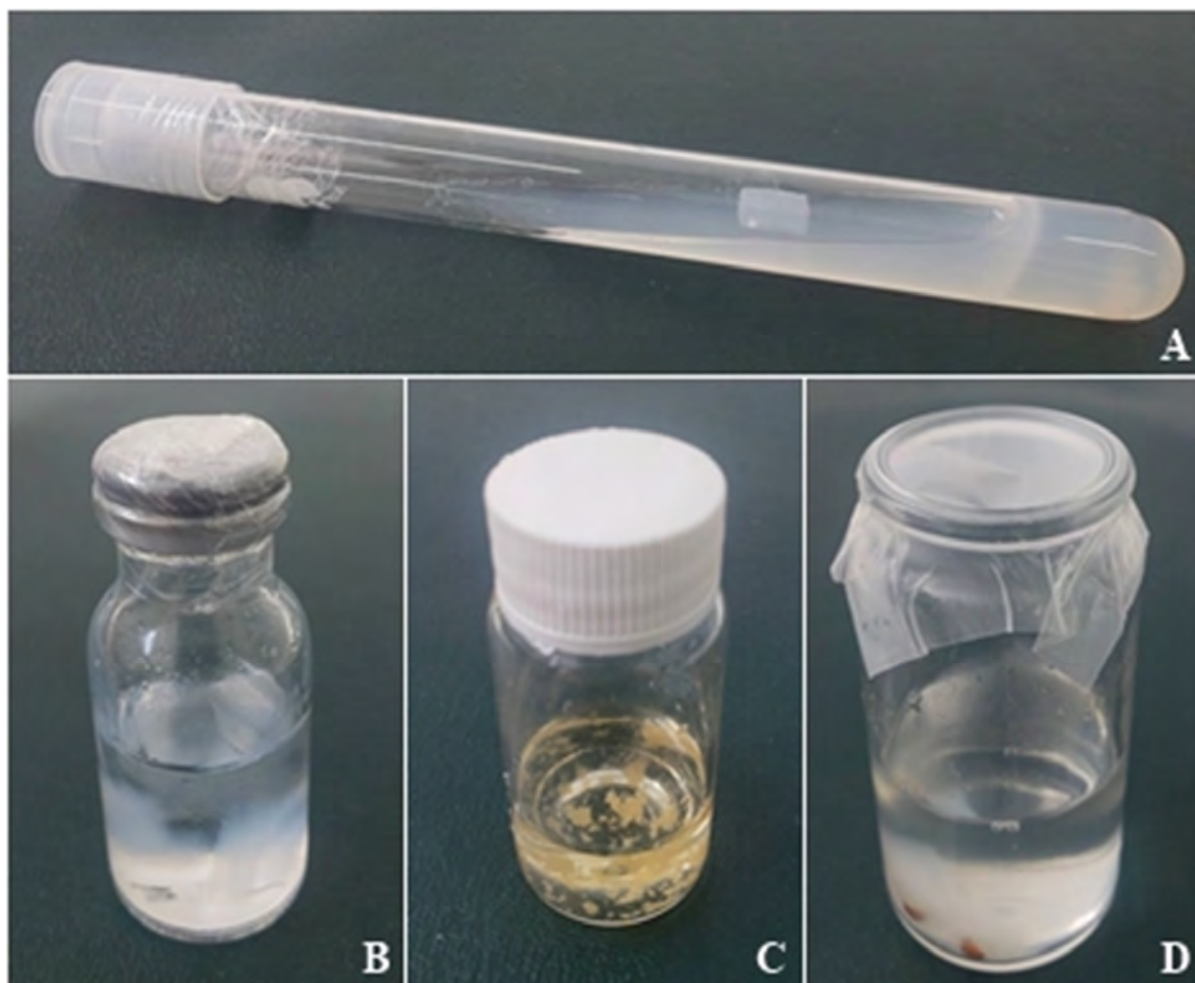


Figura 10. Técnicas de preservação. A. Preservação em tubos de ensaio. B. Preservação em água destilada estéril ou método Castellani. C. Preservação em meio de cultura líquido. D. Preservação em frascos Wheaton (com sementes de sorgo).

6.4.3. Técnica

- Em câmara de fluxo laminar, em condições de máxima assepsia e com instrumentos esterilizados, adicionar 2 a 3 discos ou pedaços da colônia fúngica no frasco contendo a água destilada esterilizada + 4 metades de sementes de sorgo (*Sorghum* sp.) que devem ser previamente preparadas (vide tópico 2.2.4);
- Tampar os frascos com papel Parafilm® ou papel alumínio. Se for papel alumínio realizar com uma agulha de insulina pequenos e espalhados furos. Se for o Parafilm®, não há necessidade de furar, pois o mesmo já contém micro furos que permitem a entrada de ar;
- Incubar em câmara climática BOD a aproximadamente 25°C até o desenvolvimento das colônias nas sementes de sorgo;
- Armazenar os frascos, preferencialmente, em câmara fria (em torno de 17 a 18 °C).

Deve ser ressaltado que, os utensílios não autoclaváveis, devem ser esterilizados com lâmpada germicida (UV) dentro da câmara de fluxo laminar

durante, no mínimo, 30 minutos imediatamente antes do uso. Os materiais utilizados devem ser limpos com solução de etanol 70% e aqueles resistentes ao fogo devem ser flambados em bico de Bunsen, ou no esterilizador infravermelho, antes dos seu uso.

Além dos métodos descritos acima, que são métodos de mais baixo custo, existem outros utilizados na preservação de fungos zoospóricos, como a criopreservação (descrito abaixo).

6.5. Preservação de fungos zoospóricos por meio da criopreservação

A criopreservação, conforme descrita no protocolo de Boyle *et al.* (2004), tem sido reportada como um dos métodos mais eficientes para preservar e manter viáveis isolados de fungos zoospóricos a longo prazo (Simmons *et al.* 2020). O protocolo está sumarizado abaixo para facilitar a aplicação cotidiana: inicialmente, inóculos de isolados purificados são transferidos para tubos Falcon® contendo 35 mL de meio líquido PmTG (35 mL). Esses isolados são mantidos por cerca de duas (espécies monocêntricas) a três semanas (quitrídias policêntricas) em modo

estacionário e temperatura ambiente (em torno de 22 °C) (figura 11A). Após este período, os tubos devem ser centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante removido para obtenção da biomassa fúngica. Durante este processo, o meio criopreservante (10 mL de meio líquido PmTG, 1 mL de dimetilsulfato (DMSO) e 1 mL de soro fetal bovino) deve ser preparado, do qual, serão adicionados 6 mL em cada tubo Falcon contendo o "pellet". Esta

mistura deve ser então "pipetada" manualmente para dissolver o "pellet" e depois 1 mL dessa solução (meio criopreservante + biomassa fúngica) deve ser adicionado a cada criotubo (recomenda-se preparar ao menos 6 criotubos por isolado). Após o período de incubação apropriado (30 min em temperatura ambiente), todos os criotubos devem ser colocados em um recipiente criopreservante e depois estocados em ultra-freezer (Figura 11B-F).



Figura 11 A-F. Protocolo de criopreservação. A. Crescimento dos isolados em meio de cultura líquido (tubos Falcon®). B-D. Transferência da solução contendo o "pellet" de tecido e meio criopreservante para os criotubos. C. Recipiente com tampa rosqueável, contendo um molde central para encaixe dos criotubos e uma espuma imersa em isopropanol (a espuma imersa em isopropanol evita que o material biológico congele de forma abrupta). E-F. Estoque dos criotubos no recipiente criopreservante (Jerônimo Alves 2018).

7. Referências bibliográficas

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1952. Introductory Mycology. 4 ed. John Wiley, Nova York.
- Bills, G.F., Christensen M., Powell M., Thorn G. 2004. Saprobic soil fungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills & M.S. Foster (eds.). Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 271-302.
- Boyle, D.G. *et al.* 2003. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. Diseases of Aquatic Organisms 56: 59-64.

- Galindo, L.J., Lopez-Garcia, P., Torruella G., Karpov S., Moreira, D. 2021. Phylogenomics of a new fungal phylum reveals multiple waves of reductive evolution across *Holomycota*. Nature Communications 12: 1-14.
- Hibbett, D. *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 111: 509-547.
- James, T.Y. *et al.* 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) description of a new phylum (Blastocladiomycota). Mycologia 98: 860-871.
- James, T.Y., Stenlid, J., Olson, Å., Johannesson, H. 2008. Evolutionary significance of 16 imbalanced nuclear ratios within heterokaryons of the basidiomycete fungus *Heterobasidion parviporum*. Evolution 62: 2279-2296.

- James, T.Y., Porter, T.M., Martin, W.W.** 2014. Blastocladiomycota. In: K. Esser (ed.). The Mycota VII Systematics and Evolution Part A. Springer, Berlin e Heidelberg, pp. 177-207.
- Jerônimo Alves, G.H.** 2018. Análise taxonômica, molecular, ecológica, e/ou ultraestrutural dos filos Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Oomycota de reservatórios da Bacia Hidrográfica do Sorocaba/Médio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil. Tese Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Kagami, M., Van Donk, E., de Bruin, A., Rijkeboer, M., Ibelings, B.W.** 2004. *Daphnia* can protect diatoms from fungal parasitism. Limnology and Oceanography 49: 680-685.
- Karling, J.S.** 1977. *Chytridiomycetorum Iconographia*. J. Cramer, Vaduz.
- Longcore, J.E.** 1995. Morphology and zoospore ultrastructure of *Entophlyctis luteolus* sp. nov. (Chytridiales): Implications for chytrid taxonomy. Mycologia 87:25-33.
- Marano, A.V., Pires-Zottarelli, C.L.A., Gleason F.H., Neuhauser, S., Steciow, M.M.** 2011. Assemblages of zoosporic true fungi, heterotrophic stramenopiles and plasmodiophorids in freshwater ecosystems. In: S.A. Browne (ed.). Aquatic Ecosystems. Nova Science publishers, v. 1, pp. 1-55.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. In: O. Fidalgo, V.L. Bononi (coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série documentos, São Paulo, pp. 17-20.
- Powell, M.J., Letcher, P.M.** 2014a. Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota. In: K. ESSER (ed.). The Mycota VII Systematics and Evolution Part A. Springer, Berlin e Heidelberg, pp. 141-175.
- Powell, M.J., Letcher, P.M.** 2014b. Phylogeny and characterization of freshwater Chytridiomycota (Chytridiomycetes and Monoblepharidomycetes). In: E.B. Gareth Jones, K.D. Hyde, K.L. Pang (eds.). Freshwater fungi. Gruyter, Berlin: pp. 133-153.
- Shearer, C.A. et al.** 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodiversity and Conservation 16: 49-67.
- Sime-Ngando, T.** 2012. Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 3, article 361. Disponível em <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00361/full> (acesso em 6-I-2025).
- Simmons et al.** 2020. The Collection of Zoosporic Eufungi at the University of Michigan (CZEUM): introducing a new repository of barcoded Chytridiomycota and Blastocladiomycota cultures. IMA Fungus 11:20.
- Sparrow Jr., F.K.** 1960. Aquatic Phycomycetes. 2 ed. Ann Arbor, University of Michigan Press, Michigan.
- Tedersoo, L. et al.** 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. Fungal diversity 90: 135-159.
- Wijayawardene, N.N. et al.** 2024. Classes and phyla of the kingdom Fungi. Fungal Diversity, volume 128, 1-165