

SARAH CRISTINA OLIVEIRA ROCHA

**Caracterização morfológica e molecular de
espécies de Leptolegniaceae e
Saprolegniaceae (Oomycota) de áreas de
Mata Atlântica do estado de São Paulo**

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

SÃO PAULO

2016

SARAH CRISTINA OLIVEIRA ROCHA

**Caracterização morfológica e molecular de
espécies de Leptolegniaceae e
Saprolegniaceae (Oomycota) de áreas de
Mata Atlântica do estado de São Paulo**

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

ORIENTADORA: DRA. CARMEN LIDIA AMORIM PIRES-ZOTTARELLI

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

Rocha, Sarah Cristina Oliveira

R672c Caracterização morfológica e molecular de espécies de Leptolegniaceae e Saprolegniaceae (Oomycota) de áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo / Sarah Cristina Oliveira Rocha -- São Paulo, 2016.

154p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Saprolegniales. 2. ITS e LSU do rDNA . 3. Taxonomia. I. Título.

CDU: 582.28:581.5

Para todos os meus sobrinhos, para que também vejam seus sonhos se realizarem!

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus por permitir que eu realizasse mais este sonho, me dando saúde e sabedoria, também porque colocou profissionais em meu caminho que me ensinaram muito. Jamais esquecerei tantos ensinamentos.

À minha mãe Maria Nunes de Oliveira pela educação que me deu, pelo exemplo de perseverança que tanto me inspirou, por me ensinar que nunca é tarde para realizar um sonho.

Ao meu esposo Elson Tiago da Paixão que me deu apoio incondicional, por todo o seu companheirismo, amor e carinho. Não teria conseguido sem você!

À minha orientadora Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli, pela amizade, por tudo o que me ensinou e por acreditar em mim, deixo aqui uma palavra de reconhecimento pelo seu profissionalismo e dedicação sem igual para com os organismos zoospóricos, com este trabalho, comigo e todos os seus alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento concedido (Processo 2014/04375-1).

Aos integrantes do projeto FAPESP (processo 2012/50222-7) realizado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), por tudo que me ensinaram e pela contribuição na execução deste trabalho.

À pesquisadora Dra. Agostina Virginia Marano pela contribuição na execução deste estudo com fornecimento de alguns espécimes da Argentina e auxílio na obtenção de algumas sequências. Agradeço também pela parceria em outros trabalhos, por lembrar-se de mim!

À pesquisadora Dra. Claudia Cristina Lopez Lastra pela contribuição no fornecimento de espécimes da Argentina.

Ao pesquisador associado Nelson Menolli Junior, pela atenção e ajuda com as análises filogenéticas, por ser meu eterno professor, obrigado por tudo que já fez por mim!

Ao pesquisador Dr. Jeferson Prado pela gentileza nos esclarecimentos em relação à nomenclatura botânica!

Aos pesquisadores Dr. José Vladimir Sandoval-Sierra e Dr. Javier Diéguez-Uribeondo do Real Jardín Botánico de Madrid, Espanha, pela atenção e colaboração com os estudos para as espécies de Saprolegnia.

Ao Instituto de Botânica (IBt) pela infra-estrutura para execução deste trabalho.

À funcionária e curadora da coleção de culturas do Instituto de Botânica (CCIBt) Marcela Castilho Boro pela atenção e apoio essencial na obtenção dos espécimes.

À todos os pesquisadores e funcionários do IBt por toda atenção, pela companhia nas tardes de café, nas conversas descontraídas e por todos os momentos de discussões e ensinamentos.

À todos os funcionários da pós-graduação do IBt pelo atendimento e prestação de serviços durante este período.

Às estagiárias FUNDAP, Damaris Venturini e Ana Lucia Vardiero Ribeiro pela paciência e ajuda na revitalização dos espécimes.

Aos meus companheiros de laboratório, Ana Lúcia de Jesus, Danilo Reis Gonçalves e Gustavo Henrique Gerônimo por toda atenção a mim dispensada e por todos os momentos de muita descontração.

Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisa em Micologia: Alex Almeida, Ana Cristina Bolanões, Larissa Bernadino Moro, Ricardo Matheus Pires e Viviana Motato Vásquez por todos os bons momentos de vivência no núcleo. Este lugar não seria o mesmo sem vocês!

Aos amigos queridos Bernardo e Cristina Ramos, por todas as risadas durante nossas longas viagens.

Aos meus queridos tios Claudio e Reginalda e suas lindas filhas Larissa e Mariana pela torcida em todos os momentos da minha vida, amo vocês!

À minha prima e amiga Márcia Maria da Silva Ribeiro, por todos os bons momentos que me proporcionou a convivência de sua linda família.

Enfim, tem minha gratidão todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

“Ter um grande talento e não desenvolver é como ter chocolate e não querer comer, ter dinheiro e não querer gastar, ter um sonho e não realizar.”

Grayce Kelly Seth Bioen

RESUMO

Saprolegniaceae *sensu lato* (Ordem Saprolegniales, Reino Straminipila) foi dividida em 1999 por M.W. Dick e colaboradores em duas famílias, Saprolegniaceae e Leptolegniaceae, considerando dados morfológicos e moleculares (região SSU do rDNA) de alguns de seus representantes. Estas famílias são compostas por espécies sapróbias e parasitas, normalmente presentes nos ecossistemas terrestres e aquáticos, onde desempenham importantes funções ecológicas. No entanto, são famílias pouco estudadas e que necessitam de um conhecimento mais aprofundado, visando o entendimento das relações filogenéticas entre os gêneros. Em vista disto, o principal objetivo deste estudo foi a caracterização morfológica e molecular de espécimes de Leptolegniaceae e Saprolegniaceae, com o intuito de contribuir para o conhecimento do grupo. Para isto, foram selecionados 45 espécimes, com a maioria proveniente de áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, os quais representaram 31 espécies pertencentes aos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Aplanopsis*, *Brevilegnia*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Phragmosporangium*, *Plectospira*, *Pythiopsis* e *Saprolegnia*. Todos os espécimes foram caracterizados em termos morfológicos e/ou moleculares (regiões LSU e ITS do rDNA) visando confirmação de identificação morfológica prévia, bem como documentados por meio de fotografias. Das espécies estudadas, 26 tiveram a identificação confirmada, com as sequências obtidas disponibilizadas no GenBank e utilizadas para análises filogenéticas. Os resultados obtidos corroboraram recente estudo realizado por G.W. Beakes e colaboradores em 2014, o qual rejeita Leptolegniaceae e aceita dentro da ordem Saprolegniales as famílias Saprolegniaceae, Verrucalvaceae e Achlyaceae, sendo esta última proposta por estes autores. Das espécies estudadas, oito foram sequenciadas pela primeira vez neste estudo, sendo elas *Achlya orion* Coker & Couch, *A. oviparvula* A.L. Rogers & Beneke, *Brevilegnia longicaulis* T.W. Johnson,

Dictyuchus pseudodictyon Coker & Braxton, *Leptolegnia eccentrica* Coker, *Phragmosporangium uniseriatum* R.L. Seym., *Pythiopsis irregularis* R.L. Seym. e *Saprolegnia truncata* R.L. Seym. As análises filogenéticas realizadas comprovaram que o gênero *Leptolegnia* pertence à Saprolegniaceae, porém este não é monofilético, com a separação de *L. eccentrica* de outros representantes do gênero. Por meio deste estudo foi também possível constatar que o gênero *Phragmosporangium* pertence à Verrucalvaceae, e não mais a Saprolegniaceae, como proposto na descrição original do gênero/espécie. Pela primeira vez espécimes coletados no Brasil são inseridos em análises filogenéticas, o que permitiu a descoberta de uma nova espécie do gênero *Saprolegnia* para a ciência. Este estudo contribuiu de forma significativa para a taxonomia de Saprolegniales e demonstra a importância da junção dos estudos morfológicos e moleculares.

Palavras-chave: Saprolegniales, ITS e LSU do r DNA, Oomycota, Taxonomia

ABSTRACT

Saprolegniaceae *sensu lato* (Order Saprolegniales, Kingdom Straminipila) was divided in 1999 by M.W. Dick and collaborators in two families, Saprolegniaceae and Leptolegniaceae considering the morphological and molecular data (SSU rDNA region) of some representatives. These two families consist of saprotrophic and parasitic species typically found in terrestrial and aquatic ecosystems performing important ecological roles. However, both families are scarcely studied being necessary more studies in order to understand the phylogenetic relationships between its genera. Considering this, the aim of this study was to characterize through the morphological and molecular data the specimens of Leptolegniaceae and Saprolegniaceae, in order to contribute to the knowledge of the group. For this, 45 specimens were selected, being the majority collected at the Atlantic Forest of São Paulo State, representing 31 species belonging to the genus *Achlya*, *Aphanomyces*, *Aplanopsis*, *Brevilegnia*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Phragmosporangium*, *Plectospira*, *Pythiopsis* and *Saprolegnia*. All specimens were characterized according to the morphology and/or molecular data (LSU and ITS rDNA regions) in order to confirm previous morphological identification and documented by photographs. From the species studied, the identity of 26 were confirmed, with the sequences obtained deposited in GenBank and used for phylogenetic analysis. The results corroborate a recent study by G.W. Beakes and collaborators in 2014, which rejects Leptolegniaceae and accepted it into the order Saprolegniales together with Saprolegniaceae, Verrucalvaceae and Achlyaceae (proposed by the authors). From the species studied, eight were sequenced for the first time in this study (*Achlya orion* Coker & Couch, *A. oviparvula* A.L. Rogers & Beneke, *Brevilegnia longicaulis* T.W. Johnson, *Dictyuchus pseudodictyon* Coker & Braxton, *Leptolegnia eccentrica* Coker, *Phragmosporangium uniseriatum* R.L. Seym., *Pythiopsis irregularis* R.L. Seym. and

Saprolegnia truncata R.L. Seym.). The phylogenetic analyses have shown that the genus *Leptolegnia* belongs to Saprolegniaceae, however this is not a monophyletic genus, considering the separation of *L. eccentrica* from the other representatives. It was observed that the genus *Phragmosporangium* belongs to Verrucalvaceae, and not to Saprolegniaceae, as proposed in the original description of the genus/species. For the first time Brazilian specimens are included into phylogenetic analysis, which contributed to the discovery of a new species of *Saprolegnia*. This study makes a significant contribution to the taxonomy of Saprolegniales and demonstrates the importance of the morphological and molecular studies.

Keyword: Saprolegniales, ITS and LSU rDNA, Oomycota, Taxonomy

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico das famílias Leptolegniaceae e Saprolegniaceae	1
1.2. Estudos moleculares com Saprolegniales.....	3
1.3. Importância dos representantes da ordem Saprolegniales	6
1.4. A ordem Saprolegniales na Mata Atlântica.....	8
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Espécimes selecionados para estudo	10
3.2. Revitalização dos espécimes	13
3.3. Estudos morfológicos	13
3.4. Documentação fotográfica	13
3.5. Metodologia molecular.....	13
3.5.1. Produção de biomassa.....	13
3.5.2. Extração e purificação do DNA genômico	14
3.5.3. Amplificação do DNA genômico	15
3.5.4. Purificação e sequenciamento do material amplificado.....	16
3.5.5. Análises filogenéticas.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Identificação final dos espécimes estudados	17
4.2. Estudo morfológico dos espécimes.....	20
4.3. Estudo filogenético dos espécimes	90
4.3.1. A ordem Saprolegniales	90
4.3.1.1. A família Saprolegniaceae	93
4.3.1.1.1. O gênero <i>Saprolegnia</i>	101
4.3.1.2. A família Achlyaceae	107
4.3.1.3. A família Verrucalvaceae	110
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXOS	130

Lista das Figuras

- Figura 1.** Localidades de origem dos espécimes utilizados neste estudo. PEFI: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga; PEIC: Parque Estadual da Ilha do Cardoso; PEIB: Parque Estadual de Ilha Bela; RBASP: Reserva Biológica de Paranapiacaba; PESM: Parque Estadual da Serra do Mar; SP: estado de São Paulo.....**12**
- Figura 2 A-D.** *Achlya androgyna* (Archer) T.W. Johnson & R.L. Seym. – **A e B.** Oogônios alongados com formação de oosferas; **C.** Oogônios ornamentados com oosferas; **D.** Oogônio ornamentado e anterídio andrógino. Barra = 10 µm.**60**
- Figura 3 A-F.** *Achlya caroliniana* Coker – **A.** Zoosporângio vazio com poros laterais; **B.** Visão da colônia com vários oogônios em formação; **C.** Anterídio díclino, ramificado; **D.** Oogônio com oósporo excêntrico e ornamentações; **E.** Oogônio com apículos e com mais de um oósporo; **F.** Oogônio com parede lisa. Barra = 10µm.....**61**
- Figura 4 A-F.** *Achlya crenulata* Ziegler – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Oogônio em formação com ornamentações; **C.** Anterídio díclino; **D.** Oogônio lateral com pedúnculo cumprido e anterídios díclinos; **E.** Oogônio com oósporos excêntricos; **F.** Oogônio com oosferas abortando. Barra = 10 µm.....**62**
- Figura 5 A-F.** *Achlya flagellata* Coker – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação cimoso do zoosporângio; **C.** Oogônio com projeções na parede e oosferas não maturando; **D.** Anterídio ramificado envolvendo o oogônio com oosferas não maturando; **E.** Oogônio lateral com parede lisa e poros na parede, oósporos excêntricos; **F.** Vários oósporos excêntricos em oogônio intercalar. Barra = 10 µm.....**63**
- Figura 6 A-F.** *Achlya hypogyna* (Coker & Pemberton) T.W. Johnson & R.L. Seym. – **A. e B.** Zoosporângios com liberação dos zoósporos aclióide; **C.** **Oogônio** intercalar com célula anteridial ornamentada; **D.** Oogônio com ornamentação e anterídio hipógino; **E.** Anterídios enrolando no oogônio com um oósporo cêntrico; **F.** Oogônio liso com oósporo cêntrico. Barra = 10 µm**64**

- Figura 7 A-F.** *Achlya orion* Coker & Couch – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação basipetalar do zoosporângio; **C.** Oogônio em formação com pedúnculo curvado; **D.** Oogônio com célula anteridial dividida; **E.** Visão geral da colônia; **F.** Oogônio com oósporos excêntricos e anterídio monóclino. Barra = 10 µm.65
- Figura 8 A-F.** *Achlya oviparvula* A.L. Rogers & Beneke – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação simpodial do zoosporângio; **C.** Oogônio em formação; **D.** Visão geral da colônia; **E.** Oogônio com um oósporo e pedúnculo longo; **F.** Oogônio com oósporo excêntrico. Barra = 10 µm66
- Figura 9 A-F.** *Achlya primoachlya* (Coker & Couch) T.W. Johnson & R.L. Seym. – **A.** Zoosporângios primários com liberação aclióide; **B.** Zoosporângios secundários com liberação traustothecóide e dictióide; **C.** Oogônios e anterídios ramificados em formação; **D.** Oogônio intercalar com oosferas; **E.** Oogônio com mais de 20 oósporos excêntricos, esféricos; **F.** Oogônio lateral com ornamentações truncadas e papiladas, oósporos excêntricos Barra = 10 µm67
- Figura 10 A-F.** *Achlya radiosa* Maurizio – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação simpodial dos zoosporângios; **C.** Oogônios e anterídios em formação; **D.** Oogônio com anterídio andrógino; **E.** Oogônio com oósporo subcêntrico e ornamentação mamiforme; **F.** Oogônio e anterídio em zoosporângio vazio. Barra = 10 µm.....68
- Figura 11 A-F.** *Aphanomyces cladogamus* Drechsler – **A e B.** Liberação aclióide dos zoósporos; **C.** Oogônio com anterídio monóclino; **D e E.** Anterídio envolto ao oogônio; **F.** Oogônio com oósporo. Barra = 10 µm.....69
- Figura 12 A-F.** *Aphanomyces stellatus* de Bary – **A.** Zoosporângio pouco diferenciado do micélio e liberação aclióide dos zoósporos; **B.** Formação dos zoósporos dentro do micélio; **C.** Formação de oogônio e anterídio; **D.** Oogônio ornamentado com anterídio ramificado; **E.** Visão geral da colônia com crescimento em ecdise de cobra; **F.** Oogônio

- com ornamentações papiladas e arranjo das gotículas lipídicas subcêntrica. Barra = 10 μm70
- Figura 13 A-D.** *Aphanomyces* sp.1 – **A.** Liberação aclióide dos zoósporos; **B.** Crescimento da cultura em ecdise de cobra; **C.** Oogônio com parede abaulada; **D.** Oogônio e oósporo alongado. Barra = 10 μm 71
- Figura 14 A-F.** *Aplanopsis terrestris* Höhnk – **A.** Oogônios com pedúnculos ramificados; **B.** Oogônio lateral e anterídio andrógino; **C e D.** Oogônio e anterídio; **E.** Oogônio com oósporo cêntrico; **F.** Oogônio com oósporo subcêntrico. Barra = 10 μm 72
- Figura 15 A-F.** *Brevilegnia longicaulis* T.W. Johnson – **A.** Visão geral da colônia; **B.** Liberação dos zoósporos dictióide; **C.** Liberação dos zoósporos aplanóide; **D.** Zoosporângios e oogônios; **E.** Oogônio em formação e anterídio díclino; **F.** Oogônio com oósporo excêntrico e anterídios. Barra = 10 μm73
- Figura 16 A-D.** *Brevilegnia minutandra* Höhnk – **A e B.** Zoósporos formados em zoosporângios; **C e D.** Oogônios com um oósporo excêntrico. Barra = 10 μm74
- Figura 17 A-F.** *Dictyuchus pseudodictyon* Coker & Braxton – **A.** Zoosporângio vazio e em formação; **B.** Renovação dos zoosporângios; **C.** Oogônios e anterídios; **D.** Oogônio com anterídio andrógino; **E.** Oogônio com anterídio díclino; **F.** Oogônio com oósporo excêntrico. Barra = 10 μm75
- Figura 18 A-F.** *Leptolegnia chapmanii* R.L. Seymour – **A.** Formação dos zoósporos pelos zoosporângios; **B.** Oogônio com anterídio monóclino; **C.** Oogônio lateral com ornamentações; **D.** Oogônio com anterídio monóclino enrolando no pedúnculo do oogônio; **E. e F.** Oósporo com formação de gotículas lipídicas subexcêntrica. Barra = 10 μm76
- Figura 19 A-F.** *Leptolegnia eccentrica* Coker – **A.** Zoosporângios e zoósporos em formação dentro do micélio; **B.** Oogônios catenulados em formação; **C.** Visão geral da

colônia; **D.** Oogônios em formação e anterídios monóclinos; **E.** Oogônio com oósporo excêntrico; **F.** Oogônio ornamentado com oósporo excêntrico. Barra = 10 µm77

Figura 20 A-F. *Phragmosporangium uniseriatum* R.L. Seym. – **A.** Zoosporângios formados a partir do micélio; **B.** Liberação dos zoósporos; **C.** Visão geral da colônia em ecdise de cobra; **D.** Zoosporângios e oogônios; **E.** Oogônio com anterídio monóclino e tubo de fertilização; **F.** Oogônio com anterídio e tubo de fertilização. Barra = 10 µm ..78

Figura 21 A-F. *Plectospira myriandra* Drechsler – **A.** Colônia com vários zoosporângios lobulares em formação; **B.** Detalhe do zoosporângio irregular; **C.** Liberação aclióide dos zoósporos; **D.** Oogônio em palha de milho envolto por anterídios; **E.** Oogônio com pedúnculo curto e oósporo com gotícula lipídica subcêntrica; **F.** Oogônio intercalar. Barra = 10 µm.....79

Figura 22 A-F. *Pythiopsis irregularis* R.L. Seym. – **A.** Zoosporângio irregular em formação; **B.** Liberação dos zoósporos; **C.** Oogônio em formação com anterídio monóclino e andrógino; **D.** Oogônio intercalar com ornamentações papiladas e tuberculadas; **E.** Oogônios com oósporos subcêntricos; **F.** Oogônio com oósporo subcêntrico e ornamentações papiladas e tuberculadas. Barra = 10 µm80

Figura 23 A-F. *Saprolegnia aenigmatica* Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo – **A.** Zoosporângio com liberação dos zoósporos saprolegnióide; **B.** Zoosporângios com renovação por proliferação interna; **C.** Oogônio em formação e anterídio díclino enrolando no pedúnculo do oogônio; **D.** Oogônio intercalar; **E.** Oogônio e anterídios; **F.** Oósporos subcêntricos. Barra = 10 µm81

Figura 24 A-F. *Saprolegnia ferax* (Gruith) Kütz – **A.** Zoosporângio com renovação por proliferação interna; **B.** Oogônio em formação com pedúnculo contorcido; **C.** Oogônio sésil com poros; **D.** Oogônio com anterídio díclino; **E.** Oogônio com um oósporo subcêntrico; **F.** Oogônio com pedúnculo curto e oósporos subcêntricos. Barra = 10 µm82

- Figura 25 A-F.** *Saprolegnia semihypogyna* S. Inaba & Tokum. – **A.** Zoosporângio com renovação simpodial; **B.** Renovação do zoosporângio por proliferação interna; **C.** Anterídio andrógino e oogônio com oósporo subexcêntrico; **D.** Oogônio com oósporo subexcêntrico e anterídio andrógino com tubo de fertilização; **E.** Anterídio semihipógino; **F.** Oogônios catenulados. Barra = 10 µm.....**83**
- Figura 26 A-F.** *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) Seym. – **A.** Zoosporângio vazio; **B.** Renovação do zoosporângio; **C.** Oogônio lateral com anterídio monóclino; **D.** Oogônio com duas oosferas em formação; **E.** Oogônios subcêntricos, catenulados; **F.** Oogônio dentro de zoosporângio vazio. Barra = 10 µm**84**
- Figura 27 A-F.** *Saprolegnia truncata* R.L. Seym. – **A.** Zoosporângios vazios; **B.** zoosporângio com renovação por proliferação interna; **C.** Visão geral da colônia; **D.** Oogônio em formação com anterídio andrógino; **E.** Oogônio lateral ornamentado com oosferas em formação; **F.** Oósporos subcêntricos. Barra = 10 µm**85**
- Figura 28 A-F.** *Saprolegnia milanezii* sp. nov. – **A.** Zoosporângio primário com liberação saprolegnióide e renovação por proliferação interna; **B.** Zoosporângio secundário esférico e formação de vários tubos de liberação; **C.** Oogônio com pedúnculo alargado próximo ao septo do oogônio; **D.** Vários anterídios em oogônio; **E.** Oogônio com dois oósporos subcêntricos; **F.** Oogônios catenulados com oósporos subcêntricos Barra = 10 µm.....**86**
- Figura 29 A-F.** *Saprolegnia* sp. 2 – **A.** Liberação dos zoósporos saprolegnióide; **B.** Oogônio intercalar com anterídios; **C.** Oogônio lateral com anterídio monóclino e pedúnculo curto; **D.** Oogônio com anterídios; **E.** Oogônio com anterídios andróginos e díclinos; **F.** Oósporos subcêntricos. Barra = 10 µm**87**
- Figura 30 A-F.** *Saprolegnia* sp. 4 – **A.** Liberação dos zoósporos saprolegnióide; **B.** Renovação do zoosporângio por proliferação interna; **C.** Oogônio em formação com anterídios díclinos e monóclinos; **D.** Visão da colônia com crescimento irregular de

hifas; **E.** Oósporo subcêntrico em colônia velha; **F.** Oogônio formado dentro do zoosporângio vazio. Barra = 10µm**88**

Figura 31 A-D. *Saprolegnia* sp. 5 – **A.** Oogônio com oosferas e anterídio; **B.** Oogônios ornamentados; **C.** Oogônio ornamentado com oósporo subcêntrico; **D.** Oogônio Oogônio intercalar com oósporo subcêntrico. Barra = 10 µm**89**

Figura 32. Árvore de Máxima Verossimilhança da região LSU do rDNA para Saprolegniales. Em negrito as sequências dos espécimes estudados**: indica as sequências identificadas de acordo com Sandoval-Sierra et al. (2014). Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap > 50 (%) para 1000 pseudo-réplicas e a barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. EUA: Estados Unidos da América. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; CEP: Coleção de culturas do Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano**94**

Figura 33. Árvore de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA de Saprolegniaceae. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. *: indica sequência identificada de acordo com Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015). Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas e na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. EUA: Estados Unidos da América. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; CEP Coleção de culturas do Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano. GHJ: Espécimes de Gustavo Henrique Jerônimo**95**

Figura 34. Árvore de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA para o gênero *Saprolegnia*. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. *: indica sequências identificadas de acordo com Sandoval-Sierra et al. (2014). **: indica sequências

identificadas de acordo com Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015). Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas e na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; EUA: Estados Unidos da América; AVM: espécimes de Agostina Virginia Marano; GHJ: espécime de Gustavo Henrique Jerônimo**104**

Figura 35. Árvore de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA para Achlyaceae. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas. Na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. EUA: Estados Unidos da América. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano**110**

Figura 36. Árvore de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA para Verrucalvaceae. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. *: Divisão apontada por Diéguez- Uribeondo et al. (2009) para linhagens evolutivas com estudos para o gênero *Aphanomyces*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas. Na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; EUA: Estados Unidos da América.....**113**

Lista das tabelas

Tabela 1. Espécimes de Leptolegniaceae sensu Dick e Saprolegniaceae de áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo utilizados neste estudo. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica.....**11**

Tabela 2. Espécimes de Leptolegniaceae *sensu* Dick e Saprolegniaceae incluídas no estudo. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica. CEP: Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano; GHJ: Espécime de Gustavo Henrique Jerônimo**12**

Tabela 3. Identificação final dos espécimes estudados. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; CEP: Coleção de Culturas do “Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. ITS e LSU: regiões sequenciadas do DNA ribossomal (rDNA). AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano; GHJ: Espécimes de Gustavo Henrique Jerônimo; Mudanças taxonômicas na identificação final são destacadas em negrito**18**

Nota: O epíteto da espécie nova descrita neste trabalho será validamente publicado em outro local, de modo que esta publicação não deve ser considerada para efeitos taxonômicos, conforme permitido pelo artigo 34.1 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica. O nome é apresentado aqui para melhor apresentação dos resultados e correta organização do texto.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico das famílias Leptolegniaceae e Saprolegniaceae

A família Saprolegniaceae, criada no século XIX e formalmente descrita no início do século XX por Coker & Matthews (1937), era a única dentro da ordem Saprolegniales (Filo Oomycota, Reino Straminipila) e composta pelos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Aplanopsis*, *Brevilegnia*, *Calyptralegnia*, *Dictyuchus*, *Geolegnia*, *Leptolegnia*, *Plectospira*, *Pythiopsis*, *Saprolegnia*, *Scoliolegnia*, *Sommerstorffia* e *Thraustotheca* (Dick 1973). Entretanto, análises morfológicas (espessura de hifas, tipo de ooplasto, zoosporogênese, diferenciação zoosporangial e tendência a ter apenas um oósporo por oogônio) e moleculares (região SSU do DNA ribossomal: rDNA) de alguns de seus representantes permitiram que Dick et al. (1999) criassem uma nova família, intitulada Leptolegniaceae, com a concomitante transferência dos gêneros *Aphanomyces*, *Leptolegnia* e *Plectospira*. Representantes destas duas famílias possuem em comum o talo eucárpico, micelial, cenocítico, de crescimento ilimitado, com zoosporângios e gametângios (oogônios e anterídios) delimitados por septos. A reprodução assexuada é por meio de zoósporos biflagelados heterocontos, e a sexuada por contato de gametângios; casos de partenogênese já foram relatados em ambas as famílias. Representantes de Leptolegniaceae *sensu* Dick et al. (1999) apresentam zoosporângios pouco diferenciados das hifas vegetativas, as quais normalmente são delgadas, e a produção de único oósporo por oogônio, em contraste com as hifas grossas, com zoosporângios bem diferenciados e a formação de vários oósporos por oogônio em Saprolegniaceae.

Alguns anos mais tarde, Johnson et al. (2002) realizaram um extenso estudo morfológico dos gêneros e espécies de Saprolegniaceae, e não consideraram a família

Leptolegniaceae, mas aceitaram a maioria dos gêneros considerados por Dick (1973), com a exceção do gênero *Scoliolegnia* (sinonímia de *Saprolegnia*). Também fizeram a inclusão na família de outros quatro gêneros, *Aphanodictyon*, *Couchia*, *Phragmosporangium* e *Protoachlya*. Embora esse seja um trabalho monográfico importante não foi, como um todo, oficialmente publicado, com exceção das novas espécies e combinações (Johnson et al. 2005 a, b).

Recentemente, no transcorrer deste estudo, publicação de Beakes et al. (2014), com base em dados morfológicos e moleculares, principalmente com estudos da região LSU do rDNA, propuseram uma reorganização em nível de família dentro da ordem Saprolegniales. Na oportunidade criaram uma nova família intitulada Achlyaceae, para acomodar espécies do gênero *Achlya* (*Achlya sensu stricto*), juntamente com *Brevilegnia*, *Dictyuchus* e *Thraustotheca*, todos compostos por espécies com oósporos excêntricos. Esta família não foi oficialmente publicada e é considerada ilegítima de acordo com o Código de Nomenclatura Botânica. Os gêneros *Aphanomyces* e *Plectospira* foram transferidos para Verrucalvaceae, família esta que antes pertencia à ordem Sclerosporales do filo Oomycota, com a rejeição da família Leptolegniaceae. Os demais gêneros da ordem foram mantidos em Saprolegniaceae, incluindo o gênero *Leptolegnia*, sendo o único dentro desta família com representantes que apresentam oósporos excêntricos. Este gênero foi destacado por estes autores como sendo de posicionamento problemático e enfatizaram a necessidade de outros estudos para o entendimento do seu posicionamento dentro de Saprolegniales. Os gêneros *Aphanodictyon* e *Phragmosporangium* não foram abordados por estes autores neste trabalho. Nessa classificação, as características morfológicas que justificam os agrupamentos das diferentes famílias são menos evidentes, no entanto, observa-se uma tendência de separação pela espessura das hifas e pelo tipo e número de oósporos por

oogônio, estando Achlyaceae representada por espécies com oósporos excêntricos (com um ou vários por oogônio) e Saprolegniaceae com espécies com vários oósporos por oogônio, normalmente cêntricos e subcêntricos. Em Verrucalvaceae predominam espécies com hifas mais delgadas, com um oósporo por oogônio. O tipo de liberação dos zoósporos pelos zoosporângios, característica muito utilizada num passado recente para a separação de gêneros, não possui agora um peso tão marcante, fato este já observado em trabalhos filogenéticos anteriores de Riethmüller et al. (1999) e Spencer et al. (2002).

1.2. Estudos Moleculares com Saprolegniales

Os estudos moleculares com representantes da ordem Saprolegniales são poucos e relativamente recentes. A primeira sequência depositada no GenBank pertence a região SSU do rDNA de *Achlya bissexualis* Coker & Couch, a qual foi utilizada para um estudo filogenético relacionando a proximidade do filo Oomycota com alguns grupos de algas (Gunderson et al. 1987). Além desta região, outros marcadores moleculares estão sendo utilizados para estudos filogenéticos com os representantes da ordem, tais como as regiões ITS e LSU do rDNA e COX2 do DNA mitocondrial (mDNA). A região LSU foi primeiramente utilizada para a ordem Peronosporales *sensu lato* (Filo Oomycota), mostrando resultados importantes para estudos em nível de diversidade dos gêneros (Briard et al. 1995). Na mesma época, Molina et al. (1995) realizaram o primeiro estudo filogenético da região ITS do rDNA, com espécies do gênero *Saprolegnia*, comparando o uso desta região com o uso da região SSU. Seus resultados apontaram para a maior variabilidade gênica da região ITS, o que apontou ser esta a melhor região para distinguir as espécies. Em 2012, Schoch e colaboradores propuseram o uso desta região como marcador universal para os fungos, considerado

um código de barras claramente definido não apenas para este grupo, mas com utilização comprovada para o filo Oomycota. Robideau et al. (2011) demonstraram a eficiência desta região para inferir a evolução das espécies dentro dos gêneros deste filo, considerada também uma região conservada em termos de mutações gênicas. Antes mesmo dos apontamentos em relação a região ITS e seu caráter conservador, Daugherty et al. (1998) utilizaram a ferramenta molecular para esta região fazendo uma correlação para o posicionamento filogenético de quatro diferentes gêneros em Saprolegniales, comparando seus resultados moleculares com a forma de liberação dos zoósporos pelos zoosporângios. Esses autores apontaram *Saprolegnia*, com liberação saprolegnióide dos zoósporos, como um gênero mais basal dentro do grupo, sendo grupo irmão de *Achlya*, com liberação aclióide, *Thraustotheca* com liberação traustotecóide e *Dictyuchus* com liberação dictiíide. Neste estudo, *Achlya* e *Thraustotheca* são considerados gêneros mais estreitamente relacionados, enquanto *Dictyuchus* parece ter divergido para uma separação ao longo da linhagem evolutiva. Riethmüller et al. (1999) trabalhando com dados moleculares da região LSU do rDNA, apresentaram os mesmos resultados para a relação entre os gêneros *Achlya* e *Thraustotheca*, sugerindo a possível transferência da espécie *Thraustotheca clavata* (de Bary) Humphrey para o gênero *Achlya*. Além disto, foi destacada neste trabalho a heterogeneidade encontrada dentro do gênero *Achlya*. Nesta mesma época, Dick et al. (1999) estudaram a região SSU do rDNA e propuseram a criação da família Leptolegniaceae, com os mesmos resultados sendo encontrados para a região COX2 do mDNA por Hudspeth et al. (2000). Esta última região também corroborou a topologia dos mecanismos de liberação apontados por Daugherty et al. (1998), e evidenciou que as ordens Leptomitales e Peronosporales são grupos irmãos de Saprolegniales. Leclerc et al. (2000), por meio de análises das regiões ITS e LSU do rDNA, obtiveram a filogenia molecular da ordem Saprolegniales com um número

bastante expressivo de espécies sequenciadas, apresentando resultados que concordaram com Dick et al. (1999), mas que contestaram os de Daugherty et al. (1998) no que se refere ao grupo basal, demonstrando ser *Aphanomyces* o gênero mais basal do grupo. Mesmo com um grande número de espécies para comparação na utilização das duas regiões, seu trabalho não obteve consenso sobre o melhor marcador molecular; além disto, este trabalho evidenciou a necessidade de um número ainda maior de sequências, de forma a melhorar os resultados filogenéticos obtidos.

Mudança importante para o gênero *Achlya* foi realizada no trabalho de Spencer et al. (2002) utilizando a região SSU do rDNA. Considerando os dados anteriores apontados em Riethmüller et al. (1999) para a heterogeneidade encontrada em *Achlya*, estes autores obtiveram em sua filogenia a formação de dois agrupamentos dentro deste gênero. Observações por meio de enfoque morfológico demonstraram que as espécies de *Achlya* com oósporos excêntricos se agrupavam e se separavam das demais espécies com oósporos cêntricos e subcêntricos. A partir disto, foi proposta a criação de um novo gênero, designado *Newbya*, compreendendo espécies caracterizadas por oósporos cêntricos e/ou subcêntricos, oogônios com ornamentações papiladas e ausência de poros na parede dos oogônios.

Atualmente o banco de dados do GenBank possui 92.212 sequências de diferentes regiões do DNA para a ordem Saprolegniales (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank acesso em 02/11/2015). Apesar da grande quantidade de sequências depositadas, existem muitas espécies ainda não sequenciadas. Além disso, existem diversas sequências com comprovação de erros de identificação das espécies, resultado de prováveis trabalhos com ausência de embasamento morfológico, o que torna o uso deste banco de dados uma fonte de erros quando utilizado como apoio para estudos, apontando para a necessidade de revisão urgente destas sequências

(Sandoval-Sierra et al. 2014, Steciow et al. 2014, Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015).

1.3. Importância dos representantes da ordem Saprolegniales

As espécies consideradas na ordem Saprolegniales, eram no passado, habitualmente chamadas de “watermolds”, assim designadas porque a maioria das espécies é encontrada em ecossistemas aquáticos (Alexopoulos et al. 1996). Esta ordem é a terceira maior e mais conhecida para o filo Oomycota (Kirk et al. 2008), composta por organismos que atuam como importantes agentes na degradação de substratos orgânicos, ocorrendo normalmente como sapróbios em ambientes terrestres e aquáticos. Algumas espécies também são registradas como agentes patogênicos que infectam uma ampla variedade de hospedeiros, principalmente animais, parasitando espécies tanto no grupo dos invertebrados como em vertebrados (Phillips et al. 2008). Como exemplo, no grupo dos invertebrados estão os insetos, ocorrendo infecções em diferentes fases do ciclo de vida (Sarowar et al. 2013, de Souza et al. 2014). Muitos destes hospedeiros são conhecidos como vetores de doenças humanas, tais como os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Araujo & Hughes 2014). Desta forma, existem estudos que são voltados para o controle biológico destes insetos, principalmente no combate aos vetores de doenças, utilizando para isso espécies da ordem Saprolegniales. Há recentes pesquisas com a espécie *Leptolegnia chapmanii* RL. Seym., a qual é utilizada no combate do mosquito *Aedes aegypti* L., o transmissor da dengue, doença que assola a região tropical do hemisfério sul, com ações no entendimento dos mecanismos de infecção (Páramo et al. 2014, 2015). Contudo, pesquisas mostram que a eficiência da patogenicidade é dependente das condições abióticas adequadas e conseqüentemente afetada pela ecologia do ambiente (Steciow et al. 2013, Gul et al. 2014). Ainda nos artrópodes, outro

grupo de hospedeiro é representado pelos crustáceos, sendo bastante analisado com relação ao parasitismo de espécies da ordem, dentre os quais *Aphanomyces astaci* Schikora é o mais conhecido e associado parasita, amplamente estudado em vertentes como ciclo de vida, métodos de infecção, genótipo e distribuição temporal e espacial dos zoósporos (Huang et al. 1994, Diéguez-Uribeondo et al. 1995, Oidtmann et al. 2004, Diéguez-Uribeondo et al. 2009, Strand et al. 2012). Este parasita era endêmico para a América do Norte, sendo introduzido na Europa por meio do comércio, estando hoje disseminado e causando graves impactos nas populações de crustáceos (Aquiloni et al. 2011). Este episódio ficou conhecido como “a praga do lagostim” responsável pela dizimação de uma grande população de lagostins nativos europeus (Phillips et al. 2008, Kozubíková et al. 2009).

Dentre os vertebrados, os peixes são os mais conhecidos e estudados hospedeiros, com registros de espécies dos gêneros *Achlya*, *Aphanomyces* e *Saprolegnia* parasitando os peixes e também seus ovos (Petrisko et al. 2008). Este parasitismo emprega valores econômicos pelo aumento das práticas de cultivos na aquicultura e piscicultura (Noga 2010). Saprolegniose é uma doença em peixes por espécies do gênero *Saprolegnia* spp., causando manchas brancas e cinzentas, resultado do crescimento micelial em regiões cutâneas do hospedeiro (Torto-Alalibo et al. 2005, van West 2006, Ke et al. 2009, Kiziewicz et al. 2013, Rezinciuc et al. 2014, Sarowar et al. 2014, Mastan 2015). Além dos peixes, os anfíbios estão entre os hospedeiros no grupo dos vertebrados, o que contribui para o declínio desse grupo, que já ocorre em detrimento também da mudança climática global (Kiesecker 2010, Blaustein et al. 2010, Hussain & Pandit 2012). Espécies dos gêneros *Aphanomyces*, *Leptolegnia*, *Saprolegnia* e *Achlya* são apontadas como parasitas secundários e facultativos em anfíbios (Ault et al. 2012, Gleason et al. 2014). *Saprolegnia ferax* (Gruith) Kütz é conhecida por

provocar mortalidade em massa em embriões de anfíbios (Romansic et al. 2009) e *S. diclina* Humphrey foi registrada por meio de dados morfológicos e moleculares parasitando embriões de uma espécie de sapo, *Bufo calamita* Laurenti (Fernández-Benítez et al. 2007). Estudo recente registrou diferentes espécies dos gêneros *Achlya* e *Saprolegnia* parasitando uma espécie de salamandra, *Ambystoma maculatum* Shaw, da região da América do Norte (Urban et al. 2015).

São reduzidos os casos de fitopatogenia dentro da ordem Saprolegniales, com exceção de alguns parasitas de plantas presentes no gênero *Aphanomyces*, causando problemas em cultivos de leguminosas onde estão focados os principais estudos nesta linha de pesquisa (Gaulin et al. 2007, Phillips et al. 2008, Diéguez-Uribeondo et al. 2009, Madoui et al. 2009).

1.4. A ordem Saprolegniales na Mata Atlântica

É conhecida uma grande diversidade de espécies da ordem Saprolegniales no Brasil (Maia et al. 2015). Das 196 espécies conhecidas para o mundo (Kirk et al. 2008), há o registro de 67 espécies no Brasil, sendo *Achlya*, *Aphanomyces* e *Saprolegnia* os gêneros melhor representados. Destas, 52 já foram registradas para o bioma Mata Atlântica, sendo 42 da família Saprolegniaceae e 10 de Leptolegniaceae *sensu* Dick, o que demonstra a grande diversidade encontrada para este grupo no bioma em questão. Este dado é ainda mais expressivo no estado de São Paulo, região que possui maior área de Mata Atlântica preservada (Garlindo-Leal & Camara 2005) e onde é possível encontrar diversos estudos taxonômicos (Beneke & Rogers 1962, Furtado 1965, Rogers et al. 1970, Lyra & Milanez 1974, Schoenlein-Crusius et al. 1990, 1992, Milanez et al. 1994, 1996, Pires-Zottarelli et al. 1995, 1996, Schoenlein-Crusius & Milanez 1998, Rocha & Pires-Zottarelli 2002, Gomes & Pires-Zottarelli 2006, 2008, Pires-Zottarelli &

Rocha 2007, Miranda & Pires-Zottarelli 2012, Jesus et al. 2013, dentre outros) com 51 espécies registradas (Maia & Carvalho 2015). No entanto, não se tem registros de trabalhos moleculares com este grupo no país, com exceção de uma espécie nova para a ciência recentemente publicada. Esta espécie, designada *Achlya catenulata* Pires-Zottarelli CLA., Jesus AL., Marano AV. & de Souza JL., foi registrada em uma área de Mata Atlântica do estado de São Paulo, coletada de amostras de água do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (Jesus et al. 2015).

Reconhecendo a existência da problemática taxonômica dentro da ordem Saprolegniales, a grande ocorrência de espécies em áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, juntamente com os avanços obtidos até agora por meio de análises moleculares de diferentes regiões do DNA, o objetivo deste estudo foi caracterizar, por meio de estudos morfológicos e moleculares, espécies das famílias Saprolegniaceae e Leptolegniaceae *sensu* Dick coletadas especialmente em diferentes áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo, com conseqüente análise filogenética.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Descrição morfológica das espécies de Leptolegniaceae *sensu* Dick e Saprolegniaceae selecionadas para o estudo;
- (ii) Confirmação da identificação dos espécimes selecionados;
- (iii) Documentação fotográfica para disponibilização de imagens das espécies em diferentes mídias;
- (iv) Caracterização molecular (regiões ITS e LSU do rDNA) das espécies selecionadas;
- (v) Construção de árvores filogenéticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécimes selecionados para estudo

Foram selecionados inicialmente 34 espécimes depositados na Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt), previamente coletados em áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo, dentre eles 22 do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), sete do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), um espécime do Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), dois espécimes da Reserva Biológica de Paranapiacaba (RBASP), um espécime do Parque Estadual de Ilha Bela (PEIB) e um espécime do Parque Estadual da Serra da Cantareira (PESC) (tabela 1). Também para este estudo foram incluídos 11 espécimes provenientes de levantamentos realizados ou em andamento no Instituto de Botânica (IBt), de forma a colaborar com os dados desta pesquisa, em especial com os estudos filogenéticos (tabela 2), sendo dois espécimes da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, seis espécimes da Argentina, (dois fornecidos pela Coleção de Culturas do Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP- CEP, um espécime coletado em poço artesiano na cidade de Mogi das Cruzes (São Paulo), um espécime coletado em Itapeperica da Serra e um espécime coletado em um reservatório no Alto Tietê (Votorantim). Os 45 espécimes selecionados representaram 31 espécies, as quais estão listadas nas tabelas 1 e 2, bem como seus locais de origem na figura 1.

Tabela 1. Espécimes de Leptolegniaceae *sensu* Dick e Saprolegniaceae de áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo utilizados neste estudo. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica

Táxon	Número na CCIBt	Origem
Straminipila		
Oomycota		
Saprolegniomycetes		
Saprolegniales		
Saprolegniaceae		
<i>Achlya androgyna</i> (Archer) T.W. Johnson & R.L. Seym.	CCIBt 3993	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. caroliniana</i> Coker	CCIBt 3870	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. crenulata</i> Ziegler	CCIBt 3997	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. flagellata</i> Coker	CCIBt 3980	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. orion</i> Coker & Couch	CCIBt 3984	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. orion</i> Coker & Couch	CCIBt 4100	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
<i>A. oviparvula</i> A.L. Rogers & Beneke	CCIBt 3996	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. oviparvula</i> A.L. Rogers & Beneke	CCIBt 2017	Parque Estadual da Serra da Cantareira
<i>A. primoachlya</i> (Coker & Couch) T.W. Johnson & R.L. Seym.	CCIBt 3982	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. radiosa</i> Maurizio	CCIBt 4039	Parque Estadual da Serra do Mar
<i>Aplanopsis terrestris</i> Höhnk	CCIBt 4037	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>Brevilegnia longicaulis</i> T.W. Johnson	CCIBt 3989	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i> Coker & Braxton	CCIBt 4028	Parque Estadual de Ilha Bela
<i>D. pseudodictyon</i> Coker & Braxton	CCIBt 4108	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>Phragmosporangium uniseriatum</i> R.L. Seym.	CCIBt 3986	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>P. uniseriatum</i> R.L. Seym.	CCIBt 4107	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
<i>P. uniseriatum</i> R.L. Seym.	CCIBt 2332	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
<i>Pythiopsis irregularis</i> R.L. Seym.	CCIBt 3985	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>Saprolegnia blelhamensis</i> de Bary	CCIBt 1991	Reserva biológica de Paranapiacaba
<i>S. diclina</i> Humphrey	CCIBt 3998	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>S. ferax</i> (Gruith.) Kütz.	CCIBt 4099	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
<i>S. ferax</i> (Gruith.) Kütz.	CCIBt 1234	Parque Estadual das fontes do Ipiranga
<i>S. megasperma</i> Coker	CCIBt 4027	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>S. parasitica</i> Coker	CCIBt 4106	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>S. truncata</i> R. L. Seym.	CCIBt 3988	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>S. terrestris</i> Cookson	CCIBt 3983	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>S. unispora</i> (Coker & Couch) R.L. Seym.	CCIBt 4001	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
Leptolegniaceae sensu Dick		
<i>Aphanomyces euteiches</i> Drechsler	CCIBt 3854	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
<i>A. stellatus</i> Drechsler	CCIBt 3994	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>A. laevis</i> de Bary	CCIBt 4026	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>Leptolegnia eccentrica</i> Coker	CCIBt 3991	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
<i>L. eccentrica</i> Coker	CCIBt 4125	Reserva Biológica de Paranapiacaba
<i>Plectospora myriandra</i> Drechsler	CCIBt 3372	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
<i>P. myriandra</i> Drechsler	CCIBt 3992	Parque Estadual da Ilha do Cardoso

Tabela 2. Espécimes de Leptolegniaceae *sensu* Dick e Saprolegniaceae incluídas no estudo. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica. CEP: Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano; GHJ: Espécime de Gustavo Henrique Jerônimo

Identificação inicial dos espécimes	Codificação	Cidade e país de origem
Straminipila		
Oomycota		
Saprolegniomycetes		
Saprolegniales		
Saprolegniaceae		
<i>Achlya caroliniana</i> Coker	AVM 4	La Plata, Argentina
<i>Achlya hypogyna</i> Coker & Pemberton	CCIBt 4079	Itapecerica da Serra, Brasil
<i>A. primoachlya</i> (Coker & Couch) T.W. Johnson & R.L. Seym.	AVM 1	La Plata, Argentina
<i>A. radiosa</i> Maurizio	CCIBt 2309	Reserva Biológica de Mogi Guaçu, Brasil
<i>Brevilegnia minutandra</i> Höhnk	CCIBt 3351	Reserva Biológica de Mogi Guaçu, Brasil
<i>Pythiopsis irregularis</i> R.L. Seym.	AVM 2	La Plata, Argentina
<i>Saprolegnia semihypogyna</i> S. Inaba & Tokum	CCIBt 4096	Mogi das Cruzes, Brasil
<i>S. subterranea</i> (Dissmann) Seym.	GHJ1	Sorocaba, Brasil
<i>S. subterranea</i> (Dissmann) Seym.	AVM 3	La Plata, Argentina
Leptolegniaceae sensu Dick		
<i>Leptolegnia chapmanii</i> R.L. Seym.	CEP 010	Buenos Aires, Argentina
<i>L. chapmanii</i> R.L. Seym.	CEP 433	Misiones, Argentina

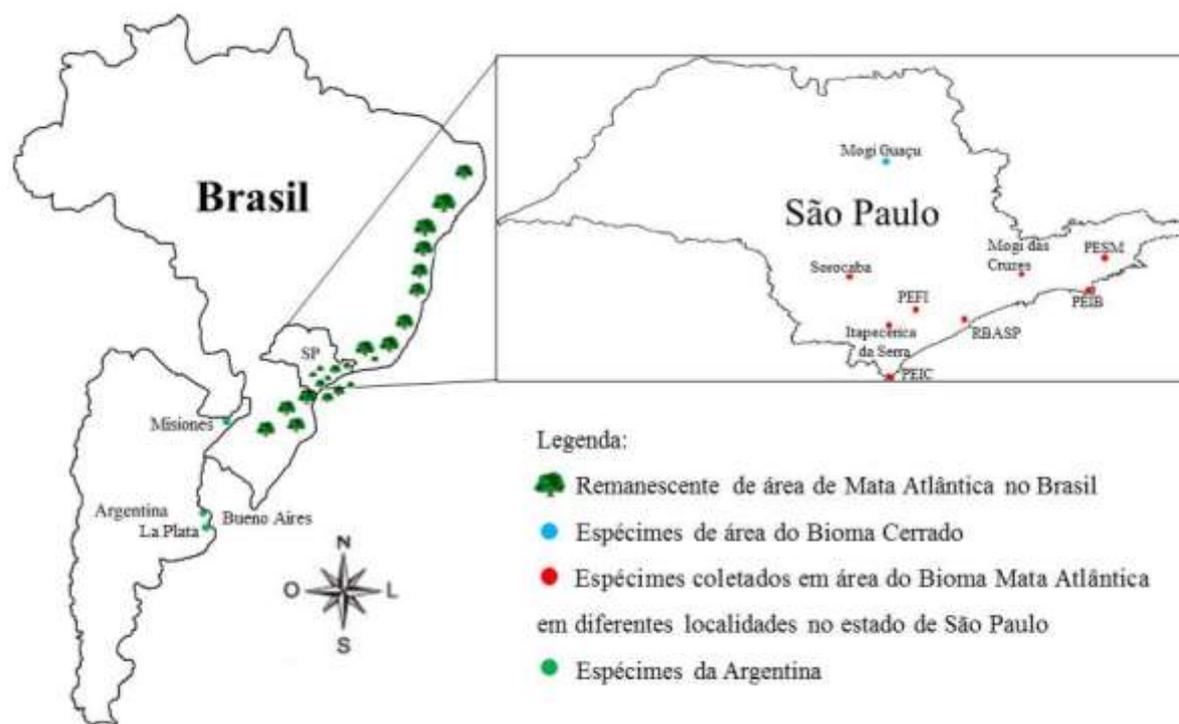


Figura 1. Localidades de origem dos espécimes utilizados neste estudo. PEFI: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga; PEIC: Parque Estadual da Ilha do Cardoso; PEIB: Parque Estadual de Ilha Bela; RBASP: Reserva Biológica de Paranapiacaba; PESM: Parque Estadual da Serra do Mar; SP: estado de São Paulo

3.2. Reativação dos espécimes

Os espécimes foram reativados utilizando-se meios de cultura específicos tais como: MP₅ (4 g de maltose, 1 g de peptona, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) e YpSs/4 (5 g de amido solúvel, 0,25 g de extrato de levedura, 0,25 g de fosfato de potássio, 0,25 g sulfato de magnésio, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) com adição de 0,4 g de penicilina, 0,2 g de sulfato de estreptomicina e 0,04 g de vancomicina depois da autoclavagem (Beneke & Rogers 1962).

3.3. Estudos morfológicos

Após a certificação da purificação dos espécimes, observações foram realizadas sob microscópio óptico, sendo as identificações confirmadas com uso de literatura específica como Johnson (1956), Sparrow (1960), Scott (1961), Seymour (1970), Johnson et al. (2002) e Johnson et al. (2005 a,b) e descrições originais das espécies. Foram elaboradas fichas para identificação e preenchidas a partir de análise e medições das principais características (estruturas assexuada e sexuada). A classificação taxonômica é baseada em Beakes et al. (2014) considerando as modificações propostas para a classificação em nível de família.

3.4. Documentação fotográfica

As espécies foram registradas por meio de microscópio utilizando o programa de captura de imagens Leica Qwin V3. As fotografias foram expostas em formato de pranchas utilizando o programa Photoimpact X3.

3.5. Metodologia molecular

3.5.1. Produção de Biomassa

A metodologia para produção de biomassa baseou-se na técnica descrita por Lamour & Finley (2006) para o gênero *Phytophthora*. Porém, algumas etapas foram manuais ao invés de automatizadas e foram utilizados microtubos de eppendorff e não

microplacas. A partir do crescimento em placas de petri com meio de cultura sólido, foram retirados pequenos fragmentos de cada cultura para a inoculação em tubos falcon (50 mL) contendo 20 mL de meio de cultura líquido (MP₅ com 4 g de maltose, 1 g de peptona e 1.000 mL de água destilada). Os tubos foram incubados de modo estacionário a aproximadamente 21°C durante 3–5 dias. Após crescimento, os fragmentos de biomassa foram retirados com uma pipeta automática, transferidos para microtubos eppendorf (1,5–2,0 mL), e então centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos para separar a biomassa do sobrenadante, o qual foi descartado. A biomassa produzida em triplicata foi concentrada em um dos microtubos, dentro do qual foi adicionado 1 mL de água ultrafiltrada e esterilizada. Os microtubos com biomassa dos espécimes foram agitados em vortex a ~2000 rpm durante 20–30 segundos e novamente centrifugados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a biomassa utilizada para extração de DNA.

3.5.2. Extração e Purificação do DNA genômico

A extração e purificação de DNA genômico dos espécimes de Leptolegniaceae *sensu* Dick e Saprolegniaceae foram realizados com o “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen™). Durante a etapa inicial indicada para a lise de células e tecidos foram adicionados 180 µL de tampão de digestão e 20 µL de proteinase K aos microtubos contendo os péletes de biomassa agitados no vortex a ~2000 rpm por 15 segundos. O material de cada microtubo foi macerado com pistilo (PES-15-B-SI, Axygen®) por cerca de 10 minutos, sendo incubado em um termobloco (Kasvi, “model K80-S01”) a 55°C durante 1 hora para a completa lise das células e liberação do DNA. Após este procedimento foram realizadas as etapas consecutivas para a ligação, lavagem e eluição do DNA com 60 µL de tampão de eluição por meio do uso de colunas de purificação do kit (“PureLink Spin Columns”) para a obtenção de DNA genômico purificado. A

eficiência da extração e purificação do DNA genômico foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) submerso em tampão TBE 1x, aplicando-se 2 µL de padrão “123 pb DNA Ladder” (Invitrogen™) + 2 µL de “Gel Loading solution, Type I, 6x” (Sigma®) no primeiro poço e 2 µL de DNA + 2 µL de “Gel Loading” nos poços seguintes. O gel de agarose (75 mL) foi aquecido em microondas e resfriado em água corrente, sendo previamente corado com 3,5 µL de “GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in water” (Biotium™). A eletroforese foi realizada em um sistema de eletroforese “Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System” (Bio-Rad) acoplado a uma fonte “PowerPac™ Basic Power Supply” (Bio-Rad) ajustada para 100 V durante 40 minutos. Os géis de agarose foram visualizados em um transiluminador UV (Kasvi). A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria no “quantificador I-Quant”, da Loccus Biotecnologia, em seguida o DNA genômico foi armazenado em congelador comum (~ -20°C) para as etapas de amplificação.

3.5.3. Amplificação do DNA genômico

A região ITS total (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA foi amplificada por PCR com os “primers” UN-up18S42 e UN-1o28S22 (Robideau et al. 2011) e com os “primers” LR0R e LR6-O (Riethmüller et al. 2002) para a região LSU. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o “PCR Supermix kit” (Invitrogen™) e o “Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂” (Sigma-Aldrich®) para o volume final de 25 µL em microtubos de 200 µL, sendo 22,5 µL de “PCR Supermix”, 0,75 µL de cada primer na concentração de 10 µM e 1 µL de DNA genômico. O programa do termociclador para a amplificação por PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C 3 minutos, 94°C 1 minuto, 54°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, 35 ciclos de 94°C 1 minuto, 72°C 7 minutos e manutenção a 12°C (∞). A eficiência da PCR e a quantificação do DNA foram avaliadas por eletroforese anteriormente descrita, porém aplicando-se o padrão

quantitativo de 10 μ L de “Low Range Quantitative DNA Ladder” (Invitrogen™) no primeiro poço. O material amplificado foi armazenado em geladeira (5-8°C).

3.5.4. Purificação e sequenciamento do material amplificado

Foi realizada purificação do material amplificado com o “AxyPrep PCR Clean-up Kit” utilizando-se 30 μ L de tampão eluente e armazenado em congelador comum (~-20°C). As amostras purificadas foram sequenciadas em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™) instalado no CEGH-USP, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, USP (<http://genoma.ib.usp.br>). Posteriormente, as sequências foram editadas manualmente utilizando-as no programa “Sequencher™ Version 4.1.4”, para a realização dos “cortes” de suas extremidades, montagem dos “contigs”, correção de bases ambíguas de acordo com os cromatogramas e obtenção das sequências consenso.

3.5.5. Análises filogenéticas

As sequências obtidas no presente estudo foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se a ferramenta de busca “Nucleotide Basic Local Alignment Search tool” (BLASTn). O critério considerado para a confirmação da identificação das espécies na base molecular foi de 97-100% de identidade máxima, obtida após análise no algoritmo BLASTn, se em concordância com os dados morfológicos. Os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados no programa online MAFFT versão 7 (Kazutaka & Daron 2013) e a correção do alinhamento e eliminação de regiões ambíguas editadas no programa Geneious (versão 8.0.5). O melhor modelo de substituição foi selecionado usando o critério de informação de Akaike no jModeltest 0.1.1 (Posada 2008). As árvores filogenéticas pelo método de máxima verossimilhança foram realizadas no programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013) usando o melhor modelo para substituição de nucleotídeos e suporte para o modelo de bootstrap obtidos com 1000 pseudo-réplicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação final dos espécimes estudados

Das 31 espécies estudadas, 26 tiveram sua identificação certificada por meio dos estudos morfológicos e/ou moleculares realizados, com quatro delas deixadas em nível genérico (tabela 3). Destas, três pertencem ao gênero *Saprolegnia*: *Saprolegnia* sp.2 CCIBt 3983, *Saprolegnia* sp.4 CCIBt 1234 e *Saprolegnia* sp.5 CCIBt 1991, para as quais foi seguido um protocolo recentemente publicado, o qual enfatiza como de extrema importância que exista ao menos dois espécimes para cada nova espécie a ser proposta (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015), de forma que para nenhum destes espécimes foi possível propor uma nova espécie até o momento. De forma diferente, para dois espécimes do gênero *Saprolegnia*, inicialmente identificados como *Saprolegnia unispora* (Coker & Couch) R.L. Seym. CCIBt 4001 e *S. megasperma* Coker CCIBt 4027, os estudos morfológicos e moleculares realizados indicaram pertencerem a uma mesma espécie, sendo esta nova para a ciência, atendendo assim o protocolo citado acima. Outro espécime identificado apenas em nível de gênero foi *Aphanomyces* sp.1 CCIBt 4026, que se tornou inviável devido a contaminação e concomitante perda do espécime, impedindo aprofundamento dos estudos.

De forma geral, a maioria dos espécimes viáveis da ordem Saprolegniales aqui estudados não apresentaram dificuldades para cultivo em meio de cultura sólido/líquido e demais processos moleculares (extração até sequenciamento do rDNA). No entanto, para os espécimes *Phragmosporangium uniseriatum* CCIBt 2332 e *Plectospira myriandra* CCIBt 3372, sequências para a região LSU do rDNA não foram obtidas, mesmo após três sucessivas tentativas.

Tabela 3. Identificação final dos espécimes estudados. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; CEP: Coleção de Culturas do “Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. ITS e LSU: regiões sequenciadas do DNA ribossomal (rDNA). AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano; GHJ: Espécimes de Gustavo Henrique Jerônimo; Mudanças taxonômicas na identificação final são destacadas em negrito

Identificação inicial	Codificação	Região ITS do rDNA	Região LSU do rDNA	Identificação final
<i>Achlya androgyna</i>	CCIBt 3993	KP006459	KP006452	<i>Achlya androgyna</i>
<i>A. caroliniana</i>	CCIBt 3870	KP006458	KP006451	<i>A. caroliniana</i>
<i>A. caroliniana</i>	AVM 4	-----	-----	<i>A. caroliniana</i>
<i>A. oviparvula</i>	CCIBt 2017	KU052568	-----	<i>A. caroliniana</i>
<i>A. crenulata</i>	CCIBt 3997	KP006457	KT964699	<i>A. crenulata</i>
<i>A. flagellata</i>	CCIBt 3980	KR063222	KR063221	<i>A. flagellata</i>
<i>A. hypogyna</i>	CCIBt 4079	KP006461	KP166540	<i>A. hypogyna</i>
<i>A. orion</i>	CCIBt 3984	KT213550	KT964700	<i>A. orion</i>
<i>A. orion</i>	CCIBt 4100	KT935272	KT935267	<i>A. orion</i>
<i>A. oviparvula</i>	CCIBt 3996	KT213551	KT964701	<i>A. oviparvula</i>
<i>A. primoachlya</i>	CCIBt 3982	KM058754	KM058757	<i>A. primoachlya</i>
<i>A. primoachlya</i>	AVM 1	-----	-----	<i>A. primoachlya</i>
<i>A. radiosa</i>	CCIBt 4039	KT935273	KT935268	<i>A. radiosa</i>
<i>A. radiosa</i>	CCIBt 2309	KT935274	KT935269	<i>A. radiosa</i>
<i>Aphanomyces euteiches</i>	CCIBt 3854	KT935285	KT935289	<i>Aphanomyces cladogamus</i>
<i>A. stellatus</i>	CCIBt 3994	KP006462	KP006454	<i>A. stellatus</i>
<i>Aphanomyces laevis</i>	CCIBt 4026	-----	-----	<i>Aphanomyces sp.1</i>
<i>Aplanopsis terrestris</i>	CCIBt 4037	KM058753	KM058756	<i>Aplanopsis terrestris</i>
<i>Brevilegnia longicaulis</i>	CCIBt 3989	KM245939	KM245940	<i>Brevilegnia longicaulis</i>
<i>B. minutandra</i>	CCIBt 3351	KT935274	KT935270	<i>B. minutandra</i>
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	CCIBt 4028	KT935276	KT935271	<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>
<i>D. pseudodictyon</i>	CCIBt 4108	KT213552	KT964702	<i>D. pseudodictyon</i>
<i>Leptolegnia chapmanii</i>	CEP 010	KT935277	KT935280	<i>Leptolegnia chapmanii</i>
<i>L. chapmanii</i>	CEP 433	KT935278	KT935281	<i>L. chapmanii</i>
<i>L. eccentrica</i>	CCIBt 3991	KT213553	KT935282	<i>L. eccentrica</i>
<i>L. eccentrica</i>	CCIBt 4125	KT935279	KT935283	<i>L. eccentrica</i>
<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>	CCIBt 3986	KT213554	KT935290	<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>
<i>P. uniseriatum</i>	CCIBt 4107	KT935286	KT935291	<i>P. uniseriatum</i>
<i>P. uniseriatum</i>	CCIBt 2332	KT935287	-----	<i>P. uniseriatum</i>
<i>Plectospora myriandra</i>	CCIBt 3372	KT935288	-----	<i>Plectospora myriandra</i>
<i>P. myriandra</i>	CCIBt 3992	KR063220	KR063219	<i>P. myriandra</i>
<i>Pythiopsis irregularis</i>	CCIBt 3985	KT213555	KT935284	<i>Pythiopsis irregularis</i>
<i>P. irregularis</i>	AVM 2	-----	-----	Indefinido
<i>Saprolegnia diclina</i>	CCIBt 3998	KT336498	KT964704	<i>Saprolegnia aenigmatica</i>
<i>S. parasitica</i>	CCIBt 4106	KT964707	KT964703	<i>S. aenigmatica</i>
<i>S. ferax</i>	CCIBt 4099	KT964708	KT964705	<i>S. ferax</i>
<i>S. semihypogyna</i>	CCIBt 4096	KT964709	KT964706	<i>S. semihypogyna</i>
<i>S. subterranea</i>	GHJ 1	-----	-----	<i>S. subterranea</i>
<i>S. subterranea</i>	AVM 3	-----	-----	<i>S. subterranea</i>
<i>S. truncata</i>	CCIBt 3988	KT213556	KT983774	<i>S. truncata</i>
<i>S. megasperma</i>	CCIBt 4027	-----	-----	<i>S. milanezii sp.nov</i>
<i>S. unispora</i>	CCIBt 4001	-----	-----	<i>S. milanezii sp.nov</i>
<i>S. terrestris</i>	CCIBt 3983	-----	-----	<i>Saprolegnia sp.2</i>
<i>S. ferax</i>	CCIBt 1234	-----	-----	<i>Saprolegnia sp.4</i>
<i>S. blelhamensis</i>	CCIBt 1991	-----	-----	<i>Saprolegnia sp.5</i>

Os espécimes de *Achlya primoachlya* AVM 1, *Pythiopsis irregularis* AVM 2, *Saprolegnia subterranea* AVM 3 e *Achlya caroliniana* AVM 4 não puderam ser incluídos nas análises morfológicas, pois foram perdidos devido a contaminação. Após identificação inicial morfológica, estudos moleculares foram realizados. No entanto, estes isolados não foram incorporados em nenhuma coleção de cultura, dificultando assim a possibilidade de obtenção destes espécimes para estudo. Entretanto, três das sequências disponibilizadas no GenBank, foram utilizadas nas análises filogenéticas, com exceção da sequência de *Pythiopsis irregularis* AVM 2, para o qual os resultados moleculares não corroboraram as análises morfológicas. Também não foi utilizada nas análises filogenéticas a sequência da região LSU do espécime de *Achlya caroliniana* CCIBt 2017, devido a problemas na sequência obtida. Para este espécime os estudos morfológicos foram muito importantes para a identificação, pois mesmo tendo a obtenção da sequência para a região ITS, os dados moleculares se mostram inconclusivos devido a grande proximidade presente entre *Achlya oviparvula* e *Achlya caroliniana* e também pela baixa divergência nucleotídica presente no agrupamento do gênero (Riethmüller et al. 1999, Beakes et al. 2014).

Os resultados moleculares corroboram a existência das três famílias dentro da ordem Saprolegniales como apontado em Beakes et al. (2014), sendo elas Achlyaceae, Verrucalvaceae e Saprolegniaceae. Devido à complexidade da definição das espécies dentro de cada gênero, sobretudo no gênero *Achlya*, optamos, na caracterização morfológica das espécies, por não definir os gêneros dentro de suas respectivas famílias.

4.2. Estudo morfológico dos espécimes

REINO STRAMINIPILA

FILO OOMYCOTA

SAPROLEGNIOMYCETES

SAPROLEGNIALES

Gênero *Achlya* Nees (*sensu lato*)

O gênero *Achlya* foi criado para agrupar espécies que produzem zoosporângios diferenciados do micélio vegetativo, comumente alongados, e que liberam os zoósporos primários encistando no ápice do zoosporângio, designada liberação aclióide, com os zoósporos secundários nadando para o meio e deixando o cisto (Johnson et al. 2002). A renovação destes zoosporângios normalmente ocorre de forma basipetalar, cimosa e/ou simpodial. A reprodução sexuada é bastante variável dependendo da espécie, com formação de oogônios com parede ornamentada ou lisa, presença ou ausência de poros na parede do oogônio, com um ou mais oósporos, estes podendo ser do tipo excêntrico (quando este tipo de oósporo ocorre em uma espécie, normalmente não há outros tipos), subcêntrico e/ou cêntrico, com anterídios do tipo díclino, hipógino, exígino e/ou monóclino, ou ausente. Existem atualmente 50 espécies válidas para este gênero (Kirk et al. 2008), com *Achlya prolifera* Nees sendo a espécie tipo. No Brasil são conhecidas 26 espécies, sendo 21 destas registradas para o bioma Mata Atlântica (Pires-Zottarelli 2015).

Ao longo dos anos muitas foram as tentativas de dividir o gênero *Achlya* com base em diferenças morfológicas, tais como comportamento do zoosporângio, presença de ornamentação no oogônio e ainda tipo de oósporo (Coker 1923, Shanor & Conover

1942, Johnson 1956). Um exemplo disto foi a criação do gênero *Protoachlya* a partir de diferenças morfológicas apresentadas por um espécime de *Achlya paradoxa* Coker, como a liberação aclióide dos zoósporos, mas também renovação dos zoosporângios por proliferação interna, característica presente em espécies do gênero *Saprolegnia* (Coker 1923). Posteriores estudos moleculares corroboraram esta separação e a criação deste gênero (Hulvey et al. 2007, Robideau et al. 2011, Steciow et al. 2014). Os estudos moleculares também apontaram para a divisão do gênero *Achlya* em ao menos dois agrupamentos, sendo estes definidos especialmente pelo tipo de oósporo (Riethmüller et al. 1999, Spencer et al. 2002). Com base nestes resultados foi proposto o gênero *Newbya* para agrupar algumas espécies de *Achlya* com oósporos cêntricos e/ou subcêntricos (Spencer et al. 2002). Beakes et al. (2014), considerando estudos moleculares, concordaram com a separação deste gênero em dois agrupamentos, com as espécies de *Achlya* com oósporos excêntricos (*Achlya sensu stricto*) separadas das demais com outros tipos de oósporos (cêntricos e subcêntricos).

Achlya androgyna (Archer) T.W. Johnson & R.L. Seym., Mycotaxon 92: 14. 2005.

Basiônimo: *Saprolegnia androgyna* W. Archer, Quarterly Journal of Microscopical Science 7: 121. 1867.

Figura 2A-D

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, raramente observados; renovação não observada. Liberação dos zoósporos aclióide. Gemas presentes. Oogônios terminais e intercalares, alguns laterais, alongados, filiformes ou naviculados, 260–430 × 20–30 µm, alguns ovalados, 65–170 × 22,5–32 µm, raramente esféricos; parede lisa, sem poros; algumas vezes ornamentadas, ornamentações papiladas, 7,5–12,5 µm compr.; pedúnculo oogonial simples de 1–3 vezes o tamanho do oogônio.

Oosferas maturando. Anterídios raros, quando presentes andróginos; ramos anteridiaais simples; células anteridiaais simples, atracação lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, esféricos, 17,5–25 µm diâm., alguns ovais, 17,5–60 × 17,5–47,5 µm, 2–18 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3993, GenBank: KP006459, KP006452).

As características morfológicas do espécime examinado concordam com Johnson et al. (2005b). As principais características presentes nesta espécie são zoosporângios raramente observados, oogônios com formas diversas, podendo ser filiformes e/ou naviculados, alguns com ornamentações papiladas e com oósporos subcêntricos (Johnson et al. 2002). O Algoritmo BLASTn para a região ITS apresentou 99% de similaridade com a sequência de *Aplanes androgynus* (W. Archer) Humphrey (Anexo I). O gênero *Aplanes* foi criado para espécies que não produzem zoosporângios, sendo que o espécime aqui estudado apresentou zoosporângios raros. *Aplanes androgynus* é considerado sinônimo de *Achlya androgyna* (Johnson et al. 2005 b).

Achlya caroliniana Coker, Botânica Gazette 50: 381. 1910.

Figura 3A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, 200–260 × 30–40 µm, com poros laterais; renovação simpodial, as vezes cimosas. Liberação dos zoósporos aclióide, algumas vezes aplanóide; zoósporos encistados, 7,5–12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, alguns terminais, esféricos, 20–25 µm diâm., algumas vezes piriformes; parede lisa ou com projeções papiladas, sem poros; pedúnculo

oogonial simples de 1–6 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios raros, quando presentes monóclinos, alguns andróginos ou díclinos; ramos anteridiais divididos; células anteridiais simples, atracação lateral, muitas vezes não atracando os oogônios; tubo de fertilização ausente. Oósporos excêntricos, esféricos, 15–17,5 µm diâm., 1–3 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 05/XI/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3870, Genbank: KP006458, KP006451); Parque Estadual da Serra da Cantareira, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 14/XII/2005 M.L. Miranda (CCIBt 2017, GenBank: KU052568).

As características morfológicas dos espécimes estudados estão de acordo com a descrição de Johnson et al. (2002). *Achlya caroliniana* possui zoosporângios normalmente com poros na parede, presença de algumas projeções na parede do oogônio e oósporos variando em quantidade, normalmente de 1-3 por oogônio, com anterídios, quando presente, bastante ramificados e normalmente não atracando o oogônio (Coker 1923, Coker & Matthews 1937, Johnson 1956, Johnson et al. 2002). O espécime CCIBt 2017 foi inicialmente inserido na CCIBt como *Achlya oviparvula* A.L. Rogers & Beneke. Estudos morfológicos realizados no presente estudo confirmaram que o espécime é *Achlya caroliniana*. O resultado BLASTn para a região ITS do rDNA confirma a identificação dos espécimes estudados, apresentando 99% de similaridade com *Achlya caroliniana* para o espécime CCIBt 2017 (acesso GenBank: HQ643089) e 100% para o espécime CCIBt 3870 com outra sequência depositada (acesso GenBank: JX418018) (Anexo I).

Achlya crenulata Ziegler, Mycologia 40: 336. 1948.

Figura 4A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, alguns naviculados, 100–170 × 20–30 µm; renovação simpodial. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, alguns terminais, esféricos, 67,5–105 µm diâm., incluindo as ornamentações; parede ornamentada, sem poros; ornamentações crenuladas e papiladas; pedúnculo oogonial simples de 2–6 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas comumente abortivas. Anterídios díclinos; ramos anteridiais simples; células anteridiais simples, atracação lateral, algumas por projeções; mais de um anterídio por oogônio; tubo de fertilização não observado. Oósporos excêntricos, 25–30 µm diâm., 1–7 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 28/XI/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3997, GenBank: KP006457, KR063221).

As características morfológicas do espécime estudado estão de acordo com a descrição original de Ziegler (1948). As principais características desta espécie são oogônios crenulados e/ou papilados, normalmente com mais de um oósporo por oogônio, sendo estes do tipo excêntrico (Johnson et al. 2002). Resultado BLASTn para a região ITS apresentou 96% de similaridade com a única sequência depositada no GenBank (Anexo I); porém, esta é a sequência que apresenta maior similaridade com o espécime aqui estudado. Apesar da pouca similaridade, não há dúvidas de que o espécime aqui estudado é *Achlya crenulata*, com fundamento nos resultados morfológicos obtidos, sendo o tamanho de ambas as sequências fator que pode justificar tal distância.

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

Figura 5A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, $230\text{--}340 \times 40\text{--}70 \mu\text{m}$; renovação simpodial. Liberação dos zoósporos acilóide; zoósporos encistados, $7,5\text{--}10 \mu\text{m}$ diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, esféricos, $37,5\text{--}72,5 \mu\text{m}$ diâm.; parede lisa, com poros em alguns oogônios; pedúnculo oogonial simples de $\frac{1}{2}\text{--}5$ vezes o tamanho do oogônio. Oosferas normalmente abortivas. Anterídios díclinos; ramos anteridiaais divididos; células anteridiaais simples, atracação apical e por projeções; tubo de fertilização ausente. Oósporos excêntricos, esféricos, $20\text{--}25 \mu\text{m}$ diâm., 2–9 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3980, GenBank KR063222, KR063221).

As características morfológicas do espécime estudado concordam com a descrição de Johnson (1956), exceto pelo tamanho dos zoosporângios, que foram citados maiores pelo autor, $100\text{--}1930 \times 10\text{--}53 \mu\text{m}$. A espécie possui características que inclui oogônios com parede lisa, ausência ou presença de poros na parede do oogônio, oósporos excêntricos, muitos abortivos. Johnson et al. (2002) colocaram esta espécie como sinonímia de *Achlya debaryana* Humphrey justificando que a presença ou ausência de poros na parede não é considerado uma característica taxonômica suficiente para a existência das duas espécies. De fato, o espécime aqui estudado apresentou variação na formação de poros na parede do oogônio. No entanto, o mesmo apresentou anterídios díclinos, sendo para a descrição de *Achlya debaryana* os anterídios são considerados variados em tipo (Johnson et al. 2002). Johnson (1956) considera os

anterídios díclinos como predominante na cultura da espécie de *Achlya flagellata*, o que foi considerado no presente estudo. A sequência para a região ITS obteve similaridade para diversas outras sequências do GenBank, todas obtendo 99% de similaridade, sendo a maioria sequências de *Achlya caroliniana* (acessos GenBank: KF718203, JX418018, HQ643089), incluindo uma sequência de *A. flagellata* (Anexo I). Desta forma optou-se por confiar nos dados morfológicos que corroboram a identificação.

Achlya hypogyna Coker & Pemberton, Botanical Gazette Crawfordsville 45: 194 1908.

Figura 6A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, cilíndricos, 230–450 × 20–50 µm; renovação simpodial. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios terminais, alguns intercalares, raramente laterais ou sésseis, esféricos, 45–75 µm diâm.; parede lisa com alguns oogônios papilados, sem poros; pedúnculo oogonial simples, ½–3 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando, algumas abortando. Anterídios hipóginos, alguns díclinos e monóclinos, às vezes mais de um por oogônio; ramos anteridiais simples; célula anteridial simples, ornamentações papiladas em algumas células anteridiais, atracção apical; tubo de fertilização presente. Oósporos cêntricos e subcêntricos, esféricos, 27,5–50 µm diâm., 1–3 por oogônio, normalmente um.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Itapecerica da Serra, solução nutritiva de hidroponia, 28/III/2014, D.R. Gonçalves s.n. (CCIBt 4079, GenBank: KP006461, KP165040).

A maioria das características morfológicas do espécime estudado concordam com a descrição original (Coker & Pemberton 1908) e também com Johnson et al. (2005b) que a transferiu para *Protoachlya hypogyna* (Coker & Pemberton) Johnson &

Seym., os quais citam também a presença da renovação por proliferação interna, presente em espécies do gênero *Saprolegnia*. Neste espécime foram observadas liberação aclióide dos zoósporos e renovação apenas simpodial dos zoosporângios. A presença de anterídios hipóginos é característica marcante desta espécie. Resultado BLASTn para a região ITS apresentou 100% de similaridade com uma sequência de *Protoachlya* sp. depositada no GenBank (Anexo I). Apesar dos estudos moleculares mostrarem proximidade para o gênero *Protoachlya*, a publicação de Johnson et al. (2005b) foi considerada ilegítima, pois Shanor & Conover (1942) anteriormente propuseram uma espécie com este mesmo nome taxonômico. Estes autores publicaram esta nova espécie baseada na presença de renovação por proliferação interna presente no espécime por eles estudado, característica esta que não está presente na descrição original de *Achlya hypogyna* Coker & Pemberton. O espécime aqui estudado não apresentou renovação por proliferação interna, de forma que as características descritas são similares para a espécie *Achlya hypogyna*.

Achlya orion Coker & Couch, Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society 36: 100. 1920.

Figura 7A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais e laterais, fusiformes, 102,5–350 × 17,5–25 µm; renovação simpodial. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 7,5–12,5 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns terminais, esféricos, 35–52,5 µm; parede lisa, sem poros; pedúnculo oogonial simples, enrolado, curvado e contorcido de ½–4 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos e monóclinos; ramos anteridiaes divididos; células anteridiaes

simples, atracação lateral e por projeções; tubo de fertilização presente, persistindo. Oósporos excêntricos, esféricos, 22,5–27,5 µm diâm., 1–6 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3984, KT213550, KT964700); Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/IX/2014, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 4100, GenBank: KT935272, KT935267).

As características morfológicas dos espécimes estudados concordam com as descritas por Johnson et al. (2002). As principais características desta espécie são a presença de pedúnculos enrolados e contorcidos, oogônios lisos e oósporos excêntricos. Também foi observada a formação de zoosporângios laterais, e não apenas terminais, nos espécimes estudados. Estudos moleculares são apresentados pela primeira vez para esta espécie, onde os dois espécimes estudados comprovaram ser o mesmo táxon.

Achlya oviparvula A.L. Rogers & Beneke, Rickia 1: 244. 1962.

Figura 8A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, 280–530 × 30–60 µm; renovação basipetalar. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, piriformes, 22,5–27,5 × 20–22,5 µm diâm., alguns esféricos 20–32,5 µm diâm. e subglobosos, incluindo ornamentações; parede lisa ou com algumas projeções papiladas, sem poros; pedúnculo oogonial simples, de 2–8 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas normalmente maturando. Anterídios ausentes. Oósporos excêntricos, esféricos, 17,5–20 µm diâm., 1–2 por oogônio, normalmente um.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/XI/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3996, GenBank: KT213551).

As características morfológicas do espécime estudado estão de acordo com a descrição original de Rogers & Beneke (1962). A ausência de anterídios é uma característica marcante, sendo uma espécie partenogênética. Além disso, os oogônios possuem normalmente um único oósporo excêntrico. A espécie foi descrita no Brasil em 1962 isolada a partir de amostra de água coletada em um lago do Jardim botânico de São Paulo (Rogers & Beneke 1962). Estudos moleculares são apresentados pela primeira vez para esta espécie, onde foi possível o estudo de apenas um espécime. Resultado BLASTn apresentou similaridade com a sequência de *Achlya caroliniana*, concordando com os comentários de proximidade morfológica realizados pelos autores na descrição original. Apesar da proximidade morfológica e molecular, estudos com os dois espécimes mostram ser espécies diferentes não apenas pela presença/ausência de anterídios, mas também quando comparado o tamanho e quantidade de oósporos. Em *Achlya oviparvula* normalmente é formado um único oósporo que é menor do que os presentes em *A. caroliniana*. Em adição, o tamanho do pedúnculo do oogônio em *Achlya oviparvula* se mostram maiores na maioria dos oogônios, resultados estes também destacados na descrição original.

Achlya primoachlya (Coker & Couch) T. W. Johnson & R. L. Seym., Mycotaxon 92: 20. 2005.

Figura 9A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, $130\text{--}490 \times 20\text{--}40 \mu\text{m}$.; renovação basipetalar. Liberação dos zoósporos primários aclióide; traustotecóide e dictióide dos secundários; zoósporos encistados, $10\text{--}12 \mu\text{m}$ diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, esféricos, $52,5\text{--}87,5 \mu\text{m}$ diâm., incluindo ornamentações; parede ornamentada, sem poros; ornamentações truncadas, papiladas e tuberculadas; pedúnculo oogonial simples de $\frac{1}{2}\text{--}2$ vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios díclinos e monóclinos, não persistentes; ramos anteridiais divididos; células anteridiais simples, atracação apical, muitas vezes não atracando os oogônios; tubo de fertilização ausente. Oósporos excêntricos, esféricos, $15\text{--}22,5 \mu\text{m}$ diâm., 1–13 (-21) por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3982, GenBank: KM058754, KM058757).

Os zoosporângios citados por Johnson et al. (2005b) são menores, os quais mencionam $90\text{--}188 \times 12\text{--}39 \mu\text{m}$., além disso, não é citado pelos autores a liberação dictióide dos zoósporos aqui observada. A espécie é caracterizada por zoosporângios com liberação dos zoósporos primários aclióide, mas também aplanóide e traustotecóide nos secundários, ornamentações truncadas na parede do oogônio e anterídios ramificados (Johnson et al. 2002). A espécie foi descrita por Coker & Couch (1924) como *Thraustotheca primoachlya* Coker & Couch devido a presença de liberação traustotecóide dos zoósporos. No entanto, Johnson et al. (2005b), diante da observação dos zoosporângios primários com liberação aclióide a posicionaram no gênero *Achlya*.

Resultado BLASTn para a região ITS apresentou 99% de similaridade com a sequência de *Achlya primoachlya* do GenBank (Anexo I), o que corrobora a identificação.

Achlya radiosa Maurizio, Mitteilungen Deutschlan Fischerei-Vereins 57. 1899.

Figura 10A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, 210–520 × 20–50 µm.; renovação cymosa e basipetalar. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, esféricos, 22–55 µm diâm., incluindo ornamentações; parede ornamentada, sem poros; ornamentações mamiformes, algumas duplo-mamiformes (bifurcadas), 7,5–12,5 µm compr.; pedúnculo oogonial simples de 1–12 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos, raramente monóclinos; ramos anteridiaais simples; células anteridiaais simples, atracação apical; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, esféricos, 20–35 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/II/2014, *R.M. Pires s.n.* (CCIBt 4039, GenBank: KT935273, KT935268); Mogi Guaçu, Reserva Biológica de Mogi Guaçu, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 28/VII/2008 *C.A. Nascimento s.n.* (CCIBt 2309, GenBank: KT935274, KT935269).

As características morfológicas dos espécimes estudados estão de acordo com Johnson et al. (2002). A espécie é caracterizada por ornamentações mamiformes ou duplo-mamiformes na parede do oogônio e anterídios andróginos. Resultado BLASTn para as regiões ITS dos espécimes estudados apresentaram 99% de similaridade com a

sequência de *Achlya radiosa* depositada no GenBank (Anexo I), corroborando a identificação.

Gênero *Aphanomyces* de Bary

O gênero *Aphanomyces* foi criado para agrupar espécies que possuem hifas consideradas delicadas, com produção de zoosporângios pouco diferenciados do micélio vegetativo. Estes produzem e liberam os zoósporos em fileira única, sendo esta liberação do tipo aclióide, com encistamento no ápice do zoosporângio (Scott 1961). Neste gênero, os oogônios podem ser ou não ornamentados, normalmente um oósporo por oogônio, este podendo ser cêntrico ou subcêntrico, apresentando anterídios díclinos, monóclinos e/ou andróginos (Coker 1923, Scott 1961, Johnson et al. 2002). A espécie tipo foi designada por Coker & Matthews (1937) como sendo *Aphanomyces stellatus* de Bary, no entanto não houve especificação de um holótipo. Pela falta de material preservado, Johnson et al. (2002) inseriram um lectótipo como sendo o tipo para o gênero. Este gênero é bastante estudado por possuir muitas espécies patogênicas em plantas e animais, alguns de interesse econômico, apresentando atualmente 15 espécies válidas (Kirk et al. 2008). No Brasil este gênero tem o registro de oito espécies, sendo seis para o bioma Mata Atlântica. Scott (1961) por meio de estudos morfológicos tentou dividir o gênero propondo subgêneros. Sua base morfológica utilizada foi o tipo de parede do oogônio que a espécie apresentava, porém sua divisão não obteve sucesso. Diéguez-Uribeondo et al. (2009) por meio de estudos da região ITS, consideraram que o gênero é monofilético, apresentando divisão filogenética em três clados bem definidos, sendo uma que compreende todas as espécies parasitas de plantas, uma segunda que engloba os parasitas de animais e um terceiro que inclui apenas as espécies sapróbias e/ou oportunistas.

Aphanomyces cladogamus Drechsler, Journal of Agricultural Research 38: 335. 1929.

Figura 11A-F

Talo monóico. Hifas delicadas. Zoosporângios filamentosos, longos, pouco diferenciado do micélio vegetativo. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 7,5–9 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, esféricos, 22,5–35 µm diâm., parede externa lisa e interna abaulada, sem poros; pedúnculo oogonial ramificado, alguns curvados, ½–6 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios díclinos e monóclinos, até quatro anterídios por oogônio, comumente 2; ramos anteridiais simples, células anteridiais clavadas, atracação apical e lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos com gotículas lipídicas subcêntricas e cêntricas, esféricos, 15–25 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/VIII/2012, A.L. Jesus s.n. (CCIBt 3854, GenBank: KT935285, KT935289).

Devido à grande semelhança morfológica entre as espécies, este espécime foi identificado inicialmente como *Aphanomyces euteiches* Drechsler (Jesus et al. 2013). Segundo Scott (1961), características como a origem dos ramos anteridiais, bem como tendência helicoidal destes ramos, são utilizados para separar estas duas espécies, sendo estas características bastante variáveis. Resultado BLASTn para a região ITS apresenta 99% de similaridade com *Aphanomyces cladogamus*, além disso, os resultados filogenéticos apontam este táxon como a correta identificação da espécie, o que foi aceito no presente estudo (para mais detalhes ver seção 4.3.1.3). Segundo os estudos de Diéguez-Uribeondo et al. (2009) esta espécie pertence ao clado de parasitas em plantas.

Aphanomyces stellatus de Bary, Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik 2: 178. 1860.

Figura 12A-F

Talo monóico. Hifas delicadas. Zoosporângios filamentosos, longos, pouco diferenciado do micélio vegetativo. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, 9–12 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns terminais, esféricos, 30–37,5 µm diâm., incluindo as ornamentações; parede ornamentada, sem poros; ornamentações papiladas e tuberculadas; pedúnculo oogonial simples, 1–3 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios díclinos; ramos anteridiais simples; células anteridiais simples, atracação lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos com gotículas lipídicas subcêntricas, esféricos, 17,5–22,5 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em ecdise de cobra, amostra de água, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3994, GenBank: KP006462, KP006454).

As características morfológicas do espécime estão de acordo com as apresentadas na monografia de Scott (1961). Esta espécie é caracterizada por oogônios com ornamentações papiladas e tuberculadas e anterídios díclinos. Resultado BLASTn da região ITS apresenta 99% de similaridade com o representante do GenBank (Anexo D). Segundo os estudos de Diéguez-Uribeondo et al. (2009), esta espécie pertence ao clado de parasitas de animais. Estudos no Brasil registraram a espécie como sapróbio em ecdise de cobra por diversas vezes, incluindo o espécime aqui estudado, indicando uma preferência para decomposição de material queratinoso (Pirez-Zottarelli et al. 1996, Pirez-Zottarelli 1999, Miranda & Pires-Zottarelli 2012).

Aphanomyces sp.1

Figura 13A-D

Talo monóico. Hifas delicadas. Zoosporângios filamentosos, longos, pouco diferenciados do micélio vegetativo. Liberação dos zoósporos acilóide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, esféricos, 22,5 × 30,5 µm diâm.; parede externa abaulada, sem poros; pedúnculo curto, ½–2 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios monóclinos, alguns díclinos e andróginos; ramos anteridiais simples; células anteridiais simples, algumas divididas, atracção lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos com gotículas lipídicas, subcêntricas, esféricos, 17,5–25 µm diâm., 1 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em ecdise de cobra, amostra de água, 20/II/2013, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 4026).

As características morfológicas do espécime, em especial, o tamanho dos oogônios e tipo dos anterídios levaram a considerar ser a espécie *Aphanomyces laevis* de Bary, no entanto, dados moleculares para as regiões ITS e LSU não corroboram a identificação. O espécime foi perdido devido a contaminação, impedindo o aprofundamento dos estudos morfológicos.

Gênero *Aplanopsis* Höhnk

O gênero *Aplanopsis* é caracterizado pela ausência de reprodução assexuada, isto é, não produzem zoosporângios e zoósporos (Höhnk 1952). A reprodução sexuada é por meio de oogônios com parede lisa ou ornamentada, normalmente um oósporo, este pode ser cêntrico e/ou subcêntrico, com anterídios andróginos e/ou monóclinos. Em Kirk et al. (2008) consta a existência de duas espécies válidas para este gênero, sendo

estas *Aplanopsis spinosa* M.W. Dick e *Aplanopsis terrestris* Höhnk. Estudos realizados por Johnson et al. (2005b) observaram em espécimes identificados como *Aplanopsis spinosa*, a produção de zoosporângios e consequente liberação dos zoósporos tipo aclióide, fazendo então a transferência desta espécie para o gênero *Achlya*, espécie *ornata* T.W. Johnson & R.L. Seym. Isto faz com que apenas uma espécie permaneça no gênero, *Aplanopsis terrestris*, sendo esta a espécie tipo. O espécime aqui estudado constitui o primeiro registro para o Brasil (SCO. Rocha, dados não publicados).

Aplanopsis terrestris Höhnk, Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven, Sonderband 1: 127. 1952.

Figura 14A-F

Talo monóico. Hifas delicadas, 7,5–17,5 µm diâm. Zoosporângios não observados. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns intercalares, ocasionalmente terminais, esféricos, 15–30 µm diâm., alguns ovais, 25–35 × 17,5–25 µm; parede normalmente lisa ou com ornamentações papiladas em alguns oogônios, sem poros; pedúnculo oogonial ramificado e contorcido, de 1–9 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos, algumas vezes monóclinos, alguns enrolando no pedúnculo do oogônio; ramos anteridiaais divididos; células anteridiaais simples, algumas com parede irregular, atracação lateral e apical; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos e cêntricos, esféricos, 12,5–25 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/II/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 4037, GenBank: KM058753, KM058756).

As características morfológicas do espécime examinado estão de acordo com a descrição original de Höhnk (1952). A espécie é caracterizada pela produção de oogônios que podem ter a parede com ornamentações papiladas ou lisa, com um único oósporo que pode ser cêntrico ou subcêntrico (Johnson et al. 2002). O programa BLASTn para a região ITS contribuiu para a identificação da espécie apresentando 99% de similaridade com *Aplanopsis terrestris* depositado no GenBank (Anexo I). Em paralelo com este estudo, foi realizado o sequenciamento também para a região SSU desta espécie, de forma a tentar comprovar a identificação com outra região, sendo esta também disponível no banco de dados do GenBank. O resultado BLASTn para a região SSU de *Aplanopsis terrestris* apresentou 99% de similaridade com a sequência de *Aplanopsis terrestris* (Acesso GenBank: AJ238658) corroborando a identificação (SCO. Rocha, dados não publicados).

Gênero *Brevilegnia* Coker & Couch

O gênero *Brevilegnia* é caracterizado por um conjunto de diferentes tipos de liberação dos zoósporos pelos zoosporângios presente em uma única espécie, designada liberação brevilegnióide (Johnson et al. 2002). Os tipos de liberação destes zoósporos normalmente são do tipo aclióide, presente no gênero *Achlya*; dictióide, característica do gênero *Dictyuchus* e traustotecóide, presente no gênero *Thraustotheca* (Coker 1927, Johnson 1950). A reprodução sexuada é caracterizada por oogônios normalmente lisos, com produção de um oósporo excêntrico, apresentando anterídios andróginos, monóclinos e/ou díclinos. O gênero possui 15 espécies válidas de acordo com o Kirk et al. (2008), sendo *Brevilegnia subclavata* Couch o tipo do gênero. No Brasil foram registradas cinco espécies (Pires-Zottarelli 2015). Devido à versatilidade das espécies, muitas variedades foram propostas para este gênero (Coker 1927, Johnson et al. 2002).

Salvin (1942) considerou este gênero muito próximo de *Thraustotheca* observando a desintegração da parede dos zoosporângios e o comportamento dos zoósporos. Estudos filogenéticos mostram que este gênero tem relação muito próxima com *Dictyuchus* (Riethmüller et al. 1999, Beakes et al. 2014) e é distante de *Thraustotheca*, apesar de ambos fazerem parte da família Achlyaceae.

Brevilegnia longicaulis T.W. Johnson, Mycologia 42: 244. 1950.

Figura 15A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, cilíndricos, 117,5–250 (-390) × 17,5–35 µm. Liberação dos zoósporos primários aclióide, dos secundários brevilegnióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns terminais, ocasionalmente intercalares, esféricos, 27,5–35 µm diâm.; parede lisa, sem poros; pedúnculo oogonial simples, 1–6 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios díclinos, vários anterídios atracando o mesmo oogônio; ramos anteridiaais divididos; células anteridiaais simples, atracação lateral, às vezes por projeções; tubo de fertilização não observado. Oósporos excêntricos, esféricos, 22,5–27,5 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em ecdise de cobra, amostra de solo, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3989, GenBank: KM245939, KM245940).

A maioria das características morfológicas do espécime estudado está de acordo com a descrição original (Johnson 1950), no entanto, também foi observado o tipo aclióide de descarga dos zoosporângios primários. A produção de um único oósporo por oogônio e anterídios díclinos são características desta espécie (Johnson et

al. 2002). Estudos moleculares são apresentados pela primeira vez, contribuindo para a ampliação da quantidade de sequências para o gênero, visto que poucas são as sequências do gênero *Brevilegnia* depositadas no GenBank.

Brevilegnia minutandra Höhnk, Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven 1: 127. 1952.

Figura 16A-D

Descrição da espécie em Nascimento & Pires-Zottarelli (2012).

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Mogi Guaçu, Reserva Biológica de Mogi Guaçu, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/X/2008, C.A. Nascimento s.n. (CCIBt 3351, GenBank: KT935274, KT935270).

Estudos morfológicos realizados após revitalização corroboram a identificação do espécime. A espécie é caracterizada por anterídios raramente produzidos ou ausentes e oogônios pequenos se comparado com o tamanho do oogônio de outras espécies do gênero. Resultado BLASTn para a região ITS apresentou 94% de similaridade com a única sequência de *Brevilegnia minutandra* que foi depositada recentemente no GenBank (acesso GenBank: KM061378), apresentando maior similaridade (100%) com uma sequência de *Dictyuchus* sp. (Anexo I).

Gênero *Dictyuchus* Leitgeb

O gênero *Dictyuchus* é caracterizado por espécies que possuem zoosporângios normalmente alongados, decíduos, os quais produzem zoósporos que encistam dentro dos zoosporângios, com a formação de zoósporos secundários que são liberados por um

orifício individual deixando as fileiras de cistos (Johnson et al. 2002). A reprodução sexuada é por meio de oogônios normalmente com um único oósporo excêntrico, parede lisa e anterídios monóclinos, andróginos e/ou díclinos. Este gênero foi estabelecido para uma única espécie, *Dictyuchus monosporus* Leitgeb (Johnson et al. 2002), sendo esta o tipo. Atualmente são consideradas sete espécies válidas para este gênero (Kirk et al. 2008). No entanto, Johnson et al. (2002) consideram apenas duas espécies válidas, o tipo e também *Dictyuchus pseudodictyon* Coker & Braxton. No Brasil, apenas estas duas espécies anteriormente citadas são aqui conhecidas, com registros em regiões do bioma Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado (Pires-Zottarelli 2015). São poucos os estudos moleculares com espécies deste gênero, no entanto é demonstrada sua proximidade com espécies de *Brevilegnia* (Riethmüller et al. 1999, Beakes et al. 2014).

Dictyuchus pseudodictyon Coker & Braxton, Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society 46: 228. 1931.

Figura 17A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes 150–400 × 20–40 µm. Liberação dos zoósporos dictiíode; zoósporos encistados dentro dos zoosporângios, emergindo na forma biflagelada e deixando os seus cistos na forma de uma rede; rede falsa e verdadeira presentes. Gemas ausentes. Oogônios laterais e terminais, esféricos, 22,5–27,5µm diâm.; parede lisa, sem poros; pedúnculo oogonial 1–9 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos e díclinos, envolvendo o oogônio; ramos anteridiaais divididos; células anteridiaais simples, atracação lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos excêntricos, esféricos 12,5–20 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/II/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 4108, GenBank: KT213552, KT964702); Ilhabela, Parque Estadual de Ilhabela, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/II/2012, L.B. Moro s.n. (CCIBt 4028, GenBank: KT935276, KT935271).

As características morfológicas dos espécimes estudados estão de acordo com Johnson et al. (2002). Os registros morfológicos foram de fundamental importância para comprovação da identificação desta espécie, considerando que os espécimes mantiveram sua fase de reprodução sexuada somente no período em que estiveram na amostra original. A espécie é caracterizada por anterídios que envolvem todo o oogônio (Johnson et al. 2002). Estudos moleculares são apresentados pela primeira vez para esta espécie, contribuindo para o conhecimento do gênero.

Gênero *Leptolegnia* de Bary

O gênero *Leptolegnia* foi estabelecido para espécies com hifas consideradas delicadas, cujas características da reprodução assexuada incluem zoosporângios longos e pouco diferenciados do micélio vegetativo, zoósporos formados e posicionados em fileira única que nadam imediatamente após a liberação. Na reprodução sexuada a variação ocorre na parede do oogônio que pode ou não apresentar ornamentações. Os oogônios apresentam, normalmente, a formação de um oósporo, o qual é do tipo excêntrico, de acordo com Johnson et al. (2002). No entanto, na chave de identificação apresentada por estes autores consta também o tipo de oósporo subexcêntrico. Na descrição original de *Leptolegnia chapmanii* R.L. Seym., esta apresenta este tipo de oósporo citado (Seymour 1984). Ainda na reprodução sexuada pode ocorrer presença ou

ausência de anterídio; quando presente pode ser do tipo andrógino, monóclino e/ou díclino (Johnson et al. 2002). Este gênero possui cinco espécies válidas de acordo com Kirk et al. (2008), sendo designada *Leptolegnia caudata* de Bary o tipo do gênero. No Brasil são conhecidas quatro espécies, sendo três destas registradas para o bioma Mata Atlântica (Pires-Zottarelli 2015). Este é um gênero com escassos estudos em termos morfológicos e moleculares, apresentando poucos trabalhos publicados, bem como sequências no GenBank (Petrisko et al. 2008, Beakes et al. 2014).

Leptolegnia chapmanii R.L. Seym., Mycologia 76 4: 670.1984.

Figura 18A-F

Descrição da espécie em Dick et al. (1999).

Material examinado: ARGENTINA. BUENOS AIRES: Charca Melchor Romero, parasita em *Aedes albifasciatus*, 25/IX/1996, J.J. García s.n. (CEP 010, GenBank: KT935277, KT935280); MISIONES: recipiente artificial, parasita em *Aedes aegypti*, 10/08/2014, C.C. Lopez-Lastra s.n. (CEP 433, GenBank: KT935278, KT935281).

Os espécimes foram novamente estudados em termos morfológicos e corroboram a identificação realizada por Dick et al. (1999). No entanto, não foi registrada a presença de oósporos excêntricos, apenas oósporos subexcêntricos, que em sua maioria não chegavam a maturação. Além do oósporo, a presença de ornamentações na parede do oogônio são características marcantes desta espécie. É a primeira vez que esta espécie é sequenciada para a região ITS. Resultado BLASTn para esta região apontam similaridade com *Leptolegnia* sp. (Anexo I).

Leptolegnia eccentrica Coker, Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society 42: 215. 1927.

Figura 19A-F

Talo monóico. Micélio limitado, delicado. Zoosporângios filiformes e longos, algumas vezes curvados, pouco diferenciados do micélio vegetativo. Zoósporos dispostos em uma única fileira no zoosporângio; alongados durante a liberação, mas se tornando piriformes e nadando antes de encistar; zoósporos encistados, 6–8 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns catenulados ou sésseis, esféricos, 17,5–27,5 µm diâm., incluindo papilas, quando presentes; pedúnculo simples e curto. Oosferas maturando. Anterídios monóclinos, alguns andróginos; células anteridiais simples, atracação apical; tubo de fertilização ausente. Oósporos excêntricos, esféricos, 12,5–15 µm diâm., parede interna irregular ou enrugada, um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em ecdise de cobra, amostra de solo, 20/VIII/2012, *S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n.* (CCIBt 3991, GenBank: KT213553, KT935283); Paranapiacaba, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, sapróbio em ecdise de cobra, amostra de solo, 12/III/2015, *M. Kirizawa s.n.* (CCIBt 4125, GenBank: KT935279, KT935283).

Os espécimes aqui estudados estão de acordo com a descrição original (Coker 1927). Os espécimes possuem oogônios e oósporos menores quando comparados com a descrição de Johnson et al. (2002), os quais citam oogônios de 16–43 µm diâm. e oósporos de 14–38 µm diâm. De acordo com Johnson et al. (2002), todas as espécies do gênero *Leptolegnia* possuem oósporos excêntricos, sendo este o tipo de oósporos apresentado nos espécimes da espécie estudada. Esta espécie é sequenciada pela primeira vez.

Gênero *Phragmosporangium* Seymour

O gênero *Phragmosporangium* foi recentemente criado para a inserção de uma única espécie, *Phragmosporangium uniseriatum* R.L. Seym. (Johnson et al. 2005a). A reprodução assexuada neste gênero ocorre pela conversão de hifas inteiras em zoosporângios e zoósporos dispostos em uma a duas fileiras com liberação dictióide. Na reprodução sexuada é produzido normalmente um oósporo por oogônio, sendo este subcêntrico, e anterídios díclinos e monóclinos. A espécie é comum no Brasil, principalmente em áreas do bioma Mata Atlântica (Pires-Zottarelli et al. 2007).

Phragmosporangium uniseriatum R.L. Seym., Mycotaxon 92: 8. 2005.

Figura 20A-F

Talo monóico. Micélio limitado. Zoosporângios filiformes, longos, algumas vezes ramificados, com 1–2 fileiras de zoósporos, normalmente um. Liberação dos zoósporos dictióide; zoósporos encistados, 6–9 μm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, esféricos, 20–30 μm diâm., amarelados; parede lisa, ocasionalmente irregulares, algumas vezes com projeções papiladas; pedúnculo oogonial simples e curto. Oosferas maturando. Anterídios monóclinos, alguns andróginos; ramos anteridiais simples; células anteridiais simples, atracação apical; tubo de fertilização presente. Oósporos subcêntricos, algumas vezes cêntricos, 12,5–17,5 μm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em ecdise de cobra, amostra de solo, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3986, GenBank: KT213554, KT935290); São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, sapróbio

em ecdise de cobra, amostra de solo, 20/I/2015, *S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n.* (CCIBt 4107, GenBank: KT935286, KT935291); 20/VIII/2012, *C.L.A. Pires-Zottarelli s.n.* (CCIBt 2332, GenBank: KT935287).

As características morfológicas apresentadas pelos espécimes estudados concordam com a descrição original de Johnson et al. (2005a). É a primeira vez que o gênero/espécie é sequenciado.

Gênero *Plectospira* Drechsler

O gênero *Plectospira* foi estabelecido para englobar espécies com formação de zoosporângios lobulados, produzindo um tubo para liberação dos zoósporos. Este tubo de liberação libera os zoósporos em fileiras e é considerado pouco diferenciado do micélio vegetativo, onde os zoósporos encistam no ápice como ocorre em *Achlya* e *Aphanomyces* (Drechsler 1927). Na reprodução sexuada, a parede do oogônio é lisa, produzindo um único oósporo subcêntrico, com ausência ou presença de anterídios (Johnson et al. 2002). Johnson et al. (2002) consideram apenas duas espécies válidas, sendo *Plectospira myriandra* Drechsler a espécie tipo do gênero. Kirk et al. (2008) consideram quatro espécies válidas para este gênero. A espécie tipo é a única registrada para o Brasil (Pires-Zottarelli 2015). Leclerc et al. (2000) demonstraram que este gênero faz parte do grupo basal dentro da ordem Saprolegniales, juntamente com o gênero *Aphanomyces*.

Plectospira myriandra Drechsler, Journal of Agricultural Research 34: 294. 1927.

Figura 21A-F

Talo monóico. Zoosporângios lobulados. Liberação dos zoósporos aclióide. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns terminais, esféricos, (15-) 25–30 µm diâm.; parede lisa, sem poros; coloração amarelada; pedúnculo oogonial simples. Anterídios díclinos, alguns monóclinos, mais de um anterídio por oogônio; células anteridiais simples, atracção apical; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, esféricos, 15–22,5 µm diâm., um por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em palha de milho, amostra de água, 20/VIII/2012, *S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n.* (CCIBt 3992, GenBank: KR063219, KR063220); São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/VIII/2012, *A.L. Jesus s.n.* (CCIBt 3372, GenBank: KT935288).

As características dos espécimes concordam com a descrição original de Drechsler (1927). No entanto, o resultado BLASTn para as regiões ITS dos dois espécimes obtidos apresentam baixa similaridade (90% e 91%) com o representante disponível no GenBank (Anexo I), o que pode ser justificado por diferenças no tamanho das sequências. As principais características desta espécie são a presença de oogônios intercalares e laterais, com culturas que ora produzem anterídios ora não. O espécime aqui apresentou formação de oogônios em meio de cultura, mas não produziu anterídios. Os anterídios ocorreram com maior frequência em amostras iscadas em palha de milho.

Gênero *Pythiopsis* de Bary

O gênero *Pythiopsis* foi estabelecido para agrupar espécies com zoosporângios comumente curtos, em formatos esféricos, ovais, piriformes, filiformes e/ou irregulares (Johnson et al. 2002). Os zoósporos são liberados pelos zoosporângios e nadam imediatamente após a liberação como ocorre em espécies de *Saprolegnia*, no entanto, nestes zoosporângios não ocorre renovação por proliferação interna (Coker 1923, Johnson et al. 2002). A reprodução sexuada é caracterizada por oogônios com parede lisa ou ornamentada, produzindo um ou mais oósporos. Johnson et al. (2002) mencionam que os oósporos são do tipo subexcêntrico, entretanto, estes autores colocam na chave de identificação também o tipo de oósporo cêntrico e subcêntrico, com anterídios do tipo monóclino, díclino e/ou andrógino. Este gênero possui cinco espécies válidas (Kirk et al. 2008), sendo a espécie *Pythiopsis cymosa* de Bary o tipo. No Brasil há o registro de três espécies para este gênero (Pires-Zottarelli 2015) sendo duas destas descritas do Brasil, *Pythiopsis irregularis* R.L. Seym. e *Pythiopsis papilliformis* R.L. Seym. A estreita relação morfológica entre espécies deste gênero com *Saprolegnia* remete para a necessidade de trabalhos de revisão que envolvam tanto dados morfológicos quanto moleculares, visto que erros são constatados na identificação das sequências presentes no GenBank (Sandoval-Sierra et al. 2014, Steciow et al. 2014).

Pythiopsis irregularis R.L. Seym., Mycotaxon 92: 2. 2005.

Figura 22A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, filiformes e irregulares, 50–87,5 × 22,5–45 µm. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios terminais, alguns laterais e intercalares, esféricos,

22,5–72,5 μm diâm., alguns dolioformes, 37,5–67,5 \times 30–50 μm , incluindo ornamentações; ornamentações papiladas; pedúnculo oogonial simples de $\frac{1}{4}$ –3 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos; ramos anteridiaais simples; células anteridiaais simples, atracação apical; tubo de fertilização presente. Oósporos cêntricos e subcêntricos, esféricos, 25–35 μm diâm., alguns preenchendo todo o oogônio, 1–3 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3985, GenBank: KT213555, KT935284).

As características morfológicas do espécime examinado concordam com a descrição original (Johnson et al. 2005a). A espécie é caracterizada pela presença de oogônios com ornamentações papiladas e oósporos cêntricos e subcêntricos. Estudos moleculares são apresentados pela primeira vez para esta espécie. A espécie foi descrita do Brasil a partir de amostras de solo coletada em Manaus (AM) (Johnson et al. 2005a).

Gênero *Saprolegnia* Nees

O gênero *Saprolegnia* compreende espécies que produzem zooporângios normalmente alongados e renovação por proliferação interna (Johnson et al. 2002). No momento em que os zoósporos estão maduros, eles são liberados dos zoosporângios imediatamente para o meio (Coker 1923). A reprodução sexuada é bastante variável dependendo da espécie, podendo apresentar ornamentações na parede do oogônio, com produção de um ou vários oósporos; estes podem ser do tipo cêntrico, subcêntrico, subexcêntrico e/ou excêntrico; anterídios presentes ou ausentes, quando presentes podem ser díclinos, monóclinos, andróginos e/ou hipóginos (Seymour 1970, Johnson et

al. 2002). São registradas 15 espécies válidas para este gênero (Kirk et al. 2008) com *Saprolegnia ferax* (Gruith.) Kütz sendo o tipo do gênero. No Brasil são conhecidas 14 espécies, sendo 10 registros para o bioma Mata Atlântica (Pires-Zottarelli 2015). Ao longo dos anos surgiram tentativas de dividir este gênero (Coker 1923), com a criação de gêneros como *Isoachlya*, *Cladolegnia* e *Scoliolegnia* (Dick 1969, Seymour 1970), utilizando características morfológicas tais como ornamentações do oogônio e tipo de oósporo. O uso de características morfológicas variáveis fez com que estes gêneros não fossem aceitos por muitos pesquisadores (Dick 1973, Molina et al. 1995, Hulvey et al. 2007, Sandoval-Sierra et al. 2014, Beakes et al. 2014). No entanto, estudos moleculares com espécies deste gênero comprovaram que o grupo não é monofilético (Molina et al. 1995, Hulvey et al. 2007, Petrisko et al. 2008, Sandoval-Sierra et al. 2014, Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015).

Saprolegnia aenigmatica Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo, PLoS ONE 10: 7. 2015.

Figura 23A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, clavados, alguns fusiformes, 80–250 × 17,5–37,5 μm; renovação por proliferação interna. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, 10–12,5 μm diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, alguns terminais, piriformes, 50–125 × 45–80 μm, alguns esféricos 47,5–80 μm diâm.; parede lisa, sem poros; pedúnculo oogonial simples de ½–5 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios díclinos, ramos anteridiaais simples, alguns enrolando no pedúnculo; células anteridiaais simples, atracação lateral; tubo de

fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, alguns cêntricos, 20–27,5 µm diâm., 5–14 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3998, GenBank: KT336498, KT964704; CCIBt 4106, GenBank: KT964707, KT964703).

As características morfológicas dos espécimes examinados estão de acordo com a descrição original (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015). A espécie foi recentemente identificada com auxílio de estudos moleculares para a região ITS. De acordo com a descrição original, esta espécie não tem qualquer singularidade morfológica; por outro lado, apresenta características similares especialmente com *Saprolegnia parasitica* e *S. diclina* (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015). Isto pôde ser constatado neste estudo, pois inicialmente os espécimes foram identificados como *Saprolegnia diclina* (CCIBt 3998) e *S. parasitica* (CCIBt 4106) de acordo com os estudos morfológicos. Apesar de haver comprovação da existência destas duas espécies (Diéguez-Uribeondo et al. 2007, van den Berg et al. 2013), as mesmas são consideradas morfológicamente muito similares. O resultado BLASTn para as regiões ITS do rDNA corroboraram a identificação apresentando 99% de similaridade com *Saprolegnia aenigmatica* (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015) (Anexo I) para os dois espécimes estudados.

Saprolegnia ferax (Gruith.) Kütz., Phycology General 157. 1843.

Basiônimo: *Conferva ferax* Gruithuisen, Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae 29: 445. 1821.

Figura 24A-F

Talo monóico. Zooporângios terminais, alguns laterais, fusiformes e piriformes, 140–550 × 20–50 µm.; renovação por proliferação interna. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, alguns terminais, intercalares ou sésseis, piriformes, 37,5–112,5 × 35–82,5 µm; alguns esféricos; parede lisa, raramente com apículos; com poros; pedúnculo oogonial contorcido, alguns muito curtos de ¼–6 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios díclinos, alguns andróginos e monóclinos, mais de um por oogônio; ramos anteridiais simples, longos; células anteridiais simples, atracação lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, alguns cêntricos, 15–30 µm diâm.; oósporos presentes em zoosporângios vazios, 1–16 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, sapróbio em palha de milho, amostra de água, 9/IX/2014, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n (CCIBt 4099, GenBank: KT964708, KT964705).

As características morfológicas do espécime estudado estão de acordo com Johnson et al. (2002). O espécime apresentou grande variação nas características morfológicas, tais como oogônios laterais, intercalares e sésseis, oósporos variando em quantidade e anterídios díclinos, monóclinos e também andróginos, o que é relatado para esta espécie (Johnson et al. 2002). Resultado BLASTn para a região ITS corrobora a identificação apresentando 99% de similaridade com a sequência de *Saprolegnia ferax* depositada no GenBank (Anexo I).

Saprolegnia semihypogyna S. Inaba & Tokum., Mycoscience 43: 73. 2002.

Figura 25A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, cilíndricos, piriformes, 100–400 × 20–50; renovação por proliferação interna. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, algumas vezes terminais, esféricos, 25–45 µm diâm.; parede lisa, com poros; papilas proeminentes em alguns oogônios; pedúnculo oogonial ½–16 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos, semi-hipóginos, raramente díclinos; ramos anteridiaais curtos e simples; célula anteridial simples, atracação lateral; tubo de fertilização presente. Oósporos subexcêntricos, 1–3 por oogônio, normalmente um.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Mogi das Cruzes, presente em poço artesiano, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água 10/VII/2014, D.R. Gonçalves s.n. (CCIBt 4096, GenBank: KT964709, KT964706).

As características morfológicas do espécime corroboram com a descrição original de Inaba & Tokumasu (2002). A espécie é caracterizada por oósporos subexcêntricos, normalmente um por oogônio com algumas papilas na parede deste oogônio e anterídios andróginos e semi-hipóginos. Resultado BLASTn para a região ITS apresentou 100% de similaridade com a sequência de *Saprolegnia eccentrica* depositada no GenBank (acesso HQ643981). A espécie *Saprolegnia eccentrica* foi publicada dentro do gênero por Seymour (1970), apresentando como características marcantes a ausência de anterídios e oósporos excêntricos. No entanto, suas ilustrações apresentam também o tipo de oósporo subexcêntrico. Para Inaba & Tokumasu (2002), apesar das ilustrações de Seymour (1970), a ausência/presença de anterídios é

justificativa suficiente para separar as duas espécies. A ausência do material tipo impede que estudos aprofundados sejam realizados.

Saprolegnia subterranea (Dissmann) Seym., Nova Hedwigia 19: 59. 1970.

Figura 26A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, clavados, fusiformes, cilíndricos, 100–400 × 20–50 µm; renovação por proliferação interna e simpodial; formação de oogônio em zoosporângio vazio. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, 10–12,5 µm diâm. Gemas presentes, irregulares, frequentemente funcionando como zoosporângio. Oogônios laterais, algumas vezes terminais ou intercalares, esféricos, 20–45 µm diâm., incluindo algumas ornamentações; parede lisa, sem poros; presença de projeções papiladas em alguns oogônios; pedúnculo oogonial ½–3 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos, se originando perto do oogônio, alguns monóclinos; ramos anteridiais simples; células anteridiais simples, atracação apical e lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos e cêntricos, 15–37,5 µm diâm.; 1–3 por oogônio, normalmente um.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Sorocaba, Represa Médio/alto Tietê (Votorantim), sapróbio em semente de *Sorghum* spp., 25/VIII/2014, G.H. Jeronimo s.n. (GHJ 1).

As características morfológicas do espécime examinado são consistentes com a descrição de Johnson et al. (2002). O espécime tem numerosos oogônios, e alguns anterídios andróginos localizam-se próximos ao septo oogonial. A espécie foi descrita dentro do gênero *Isoachlya*, por duas vezes em 1931, por dois diferentes autores, designada *I. itoana* Nagai e *I. subterranea* Dissman (Nagai 1931, Dissman 1931).

Seymour (1970) transferiu a espécie para o gênero *Saprolegnia* como *S. subterranea* (Dissman) Seym. considerando este o binômio válido. Johnson et al. (2005b) sugeriu que a descrição de *Isoachlya itoana* foi primeiramente publicada, nomeando esta espécie *Saprolegnia itoana* (Nagai) Seym. No entanto esta mudança é considerada ilegítima (www.indexfungorum.org) não sendo aceita por alguns pesquisadores (Robideau et al. 2012, Beakes et al. 2014). As evidências apontadas para justificar esta mudança não tiveram embasamento literário, isso significa que não é defendido por nenhum trabalho científico para comprovação da primeira publicação. O resultado BLASTn para a região ITS confirma a identificação mostrando 99% de similaridade com *Saprolegnia subterranea* (Anexo I).

Saprolegnia truncata R. L. Seym., Mycotaxon 92: 9. 2005.

Figura 27A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, clavados, $130\text{--}240 \times 12,5\text{--}17,5 \mu\text{m}$.; renovação por proliferação interna. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados $7,5\text{--}10 \mu\text{m}$ diâm. Gemas ausentes. Oogônios laterais, às vezes terminais, esféricos, $37,5\text{--}70 \mu\text{m}$ diâm., incluindo ornamentações; sem poros; ornamentações papiladas e truncadas, $7,5\text{--}12,5 \times 10\text{--}22,5 \mu\text{m}$; pedúnculo oogonial $\frac{1}{2}\text{--}6$ vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando. Anterídios andróginos; ramos anteridiais simples; células anteridiais simples, atracação apical e lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, $25\text{--}45 \mu\text{m}$ diâm., 1–4 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de solo, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3988, GenBank: KT213556, KT983774).

As características morfológicas do espécime aqui estudado estão de acordo com a descrição de Johnson et al. (2005a); entretanto, os autores descrevem anterídios raros, diferente do que foi encontrado. As características morfológicas são muito marcantes, as quais incluem anterídios andróginos e ornamentações truncadas nos oogônios, sendo este espécime o segundo registro para o mundo (SCO. Rocha, dados não publicados). A espécie foi descrita do Brasil, tendo sido descrita de amostras de solo em Manaus (AM). Dados moleculares são apresentados para esta espécie pela primeira vez.

***Saprolegnia milanezii* sp. nov.**

Figura 28A-F

Talo monóico. Zoosporângios raros, terminais, fusiformes e filiformes, $140\text{--}170 \times 20\text{--}40 \mu\text{m}$; renovação por proliferação interna e basipetalar. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, $7,5\text{--}12,5 \mu\text{m}$ diâm. Gemas presentes, esféricas, algumas irregulares, com germinações frequentes; algumas funcionando diretamente como hifas, germinando e formando novo micélio ou se diferenciando em um oogônio funcional. Oogônios terminais, alguns intercalares, laterais e sésseis, piriformes $55\text{--}100 \times 42,5\text{--}97,5 \mu\text{m}$, alguns esféricos, $45\text{--}97,5 \mu\text{m}$ diâm., alguns racemosos, alguns catenulados; parede lisa, com poros; pedúnculo oogonial $\frac{1}{2}\text{--}7$ vezes o tamanho do oogônio, alguns pedúnculos são alargados próximo ao septo oogonial. Oosferas maturando, algumas abortando. Anterídios raros, monóclinos e díclinos; ramos anteridiaais divididos; células anteridiaais simples, atracação apical; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos, esféricos, $22,5\text{--}42,5 \mu\text{m}$ diâm., preenchendo todo o oogônio, 1–6(-12) por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/II/2013, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 4001, CCIBt 4027).

Os espécimes analisados apresentaram zoosporângios com proliferação interna, típica para o gênero *Saprolegnia*. Os espécimes estudados foram inicialmente identificados como *Saprolegnia unispora* (CCIBt 4001), que possui entre seus atributos a ausência de anterídio (Johnson et al. 2002) e *S. megasperma* (CCIBt 4027), a qual possui anterídios monóclinos. Ambas as espécies estão associadas com a formação de oogônios com um a dois oósporos em média. Esta nova espécie para a ciência difere de *Saprolegnia unispora* pela presença de anterídios, e difere de *S. megasperma* pela tendência a ter mais de dois oósporos por oogônio, e, apesar de ter anterídios (mesmo raros), estes não são monóclinos. Estudos morfológicos evidenciaram que estes espécimes possuem características bastante singulares, tais como zoosporângios secundários esféricos ou irregulares, com liberação por formação de tubos alongados, pedúnculo alargado próximo ao septo oogonial em alguns oogônios e presença de raros anterídios somente em colônias jovens.

Saprolegnia sp.2

Figura 29A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, $160\text{--}440 \times 20\text{--}30 \mu\text{m}$; renovação por proliferação interna. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, $10\text{--}12,5 \mu\text{m}$ diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais e terminais, esféricos, $52,5\text{--}75 \mu\text{m}$ diâm., quando intercalares irregulares; parede lisa, sem poros; pedúnculo oogonial simples, $\frac{1}{2}\text{--}5$ vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando.

Anterídios andróginos, alguns monóclinos e díclinos, raramente exígins, mais de um por oogônio; ramos anteridiaes divididos; células anteridiaes simples, atracação apical, algumas vezes lateral ou por projeções; tubo de fertilização presente. Oósporos subcêntricos, alguns cêntricos, esféricos, 27,5–32,5 μm diâm., 1–6 (-15) por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Núcleo Perequê, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., amostra de água, 20/VIII/2012, S.C.O. Rocha & C.L.A. Pires-Zottarelli s.n. (CCIBt 3983).

O espécime aqui estudado é considerado morfologicamente próximo de *Saprolegnia terrestris*. Johnson et al. (2002) descreve esta espécie com oósporos subcêntricos e cêntricos e anterídios predominantemente andróginos, o que também foi encontrado para este espécime. Apesar disso, o espécime também apresentou outras características, em menor frequência, tais como a presença de anterídios díclino e exígino. Até o presente momento não foi possível a identificação em nível específico para este espécime.

Saprolegnia sp.4

Figura 30A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, alguns laterais, fusiformes, 425–725 \times 50–100 μm ; alguns zoosporângios funcionando como oogônio; renovação por proliferação interna, as vezes basipetalar. Liberação dos zoósporos saprolegnióide ou por poros laterais nos zoosporângios; zoósporos encistados, 10–12,5 μm diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, terminais, alguns intercalares, esféricos, 45–87,5 (-100) μm diâm., alguns piriformes, de 62,5–115 \times 42,5–90 μm ; parede lisa, com poros; pedúnculo oogonial simples, $\frac{1}{2}$ –6 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas com maturação tardia em até oito dias, alguns abortando. Anterídios andróginos e

monóclinos, poucos díclinos; ramos anteridiais divididos; mais de um por oogônio; células anteridiais simples, atracação lateral; tubo de fertilização presente. Oósporos subcêntricos, alguns cêntricos, esféricos, 22,5–50 µm diâm., 1–16 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, sapróbio em semente de *Sorghum* spp., A.I. Milanez s.n. (CCIBt 1234).

O espécime foi depositado na CCIBt como *Saprolegnia ferax* proveniente de estudos morfológicos e, apesar de realmente haver similaridades com esta espécie, outras análises morfológicas realizadas, somada às análises moleculares, não corroboraram esta identificação. As características apresentadas pelo espécime a aproximam de *Saprolegnia glomerata* (Tiesenh.) A. Lund com estudos apresentados por Seymour (1970) e Johnson et al. (2002), exceto pelo tipo de oósporo que os autores descrevem como apenas cêntricos. A descrição taxonômica de um espécime coletado no continente Europeu faz menção aos dois tipos de oósporos presentes nesta espécie (Markovskaja 2006). Como a sequência deste táxon ainda não está disponível no GenBank, optou-se por mante-lo em nível de gênero, até que outros estudos comprovem sua identificação.

Saprolegnia sp.5

Figura 31A-D

Talo monóico. Zoosporângios não observados. Gemas presentes. Oogônios laterais e terminais, alguns intercalares, esféricos, 47,5–65 µm diâm., dolioformes, 42,5–102,5 × 45–47,5 µm; parede com papilas de 3,75–12,5 µm compr., sem poros; pedúnculo simples de 1–3 vezes o tamanho do oogônio. Oosferas abortando. Anterídios andróginos, alguns monóclinos, mais de um por oogônio; formação tardia; ramos

anteridiais simples; células anteridiais simples, atracação apical e lateral; tubo de fertilização não observado. Oósporos subcêntricos e subexcêntricos, esféricos, 22,5–30 µm diâm. e alongados, 27,5–32,5 × 20–22,5 µm., 1–9 por oogônio.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Paranapiacaba, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, amostra de solo, 26/V/2004, A.L. Gomes *s.n.* (CCIBt 1991).

O espécime estudado foi inicialmente identificado como *Saprolegnia blelhamensis* por Gomes & Pires-Zotarelli (2006), o qual tem por característica principal a ausência de anterídios e oósporos subexcêntricos. Estudos morfológicos recentes sugerem que as características apresentadas por este espécime são muito versáteis. Após a revitalização, este espécime apresentou características peculiares, como presença de anterídios e ausência de produção de zooporângios e zoósporos, além de oósporos subcêntricos. Na chave apresentada por Johnson et al. (2002), a presença de oósporos subcêntricos e anterídios andróginos estão presentes em *Saprolegnia asterophora* de Bary. A terceira espécie muito próxima a estas duas é *Saprolegnia subeccentrica* (M.W. Dick) Milko, apresentando anterídios presentes e oósporos apenas subexcêntricos. Resultado BLASTn para a região ITS foi inconclusivo para este espécime. Não foram encontrados registros de cepas de *Saprolegnia asterophora* e *S. subeccentrica* nas principais coleções internacionais, o que daria maior embasamento para futuros estudos da relação entre estas. No presente estudo optou-se por manter o espécime em nível de gênero até que outros estudos colaborem para a identificação em nível específico.



Figura 2 A-D. *Achlya androgyna* (Archer) T.W. Johnson & R.L. Seym. – **A e B.** Oogônios alongados com formação de oosferas; **C.** Oogônios ornamentados com oosferas; **D.** Oogônio ornamentado e anterídio andrógino. Barra = 10 μm

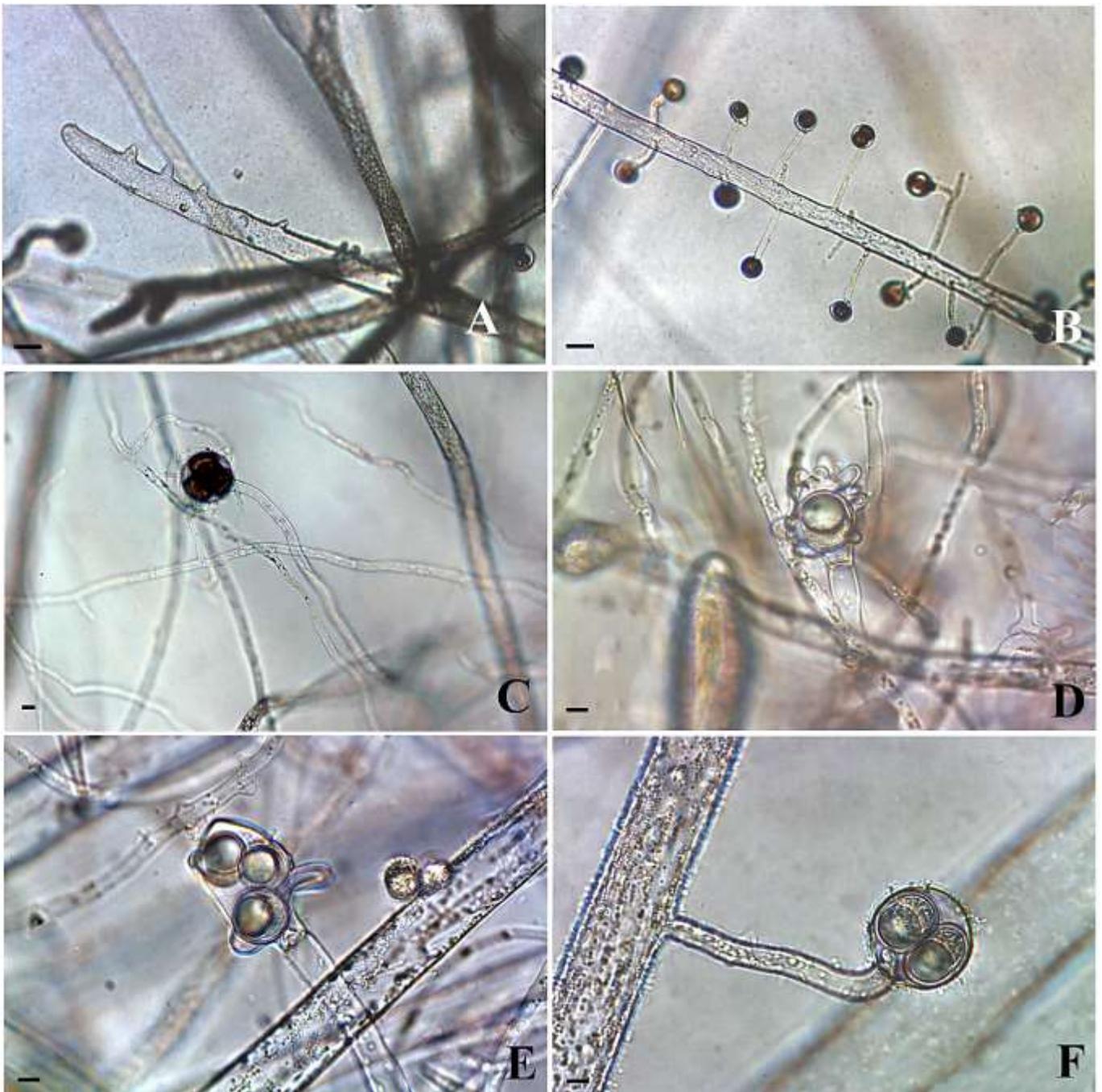


Figura 3 A-F. *Achlya caroliniana* Coker – **A.** Zoosporângio vazio com poros laterais; **B.** Visão da colônia com vários oogônios em formação; **C.** Anterídio díclino, ramificado; **D.** Oogônio com óosporo excêntrico e ornamentações; **E.** Oogônio com apículos e com mais de um óosporo; **F.** Oogônio com parede lisa. Barra = 10 μ m

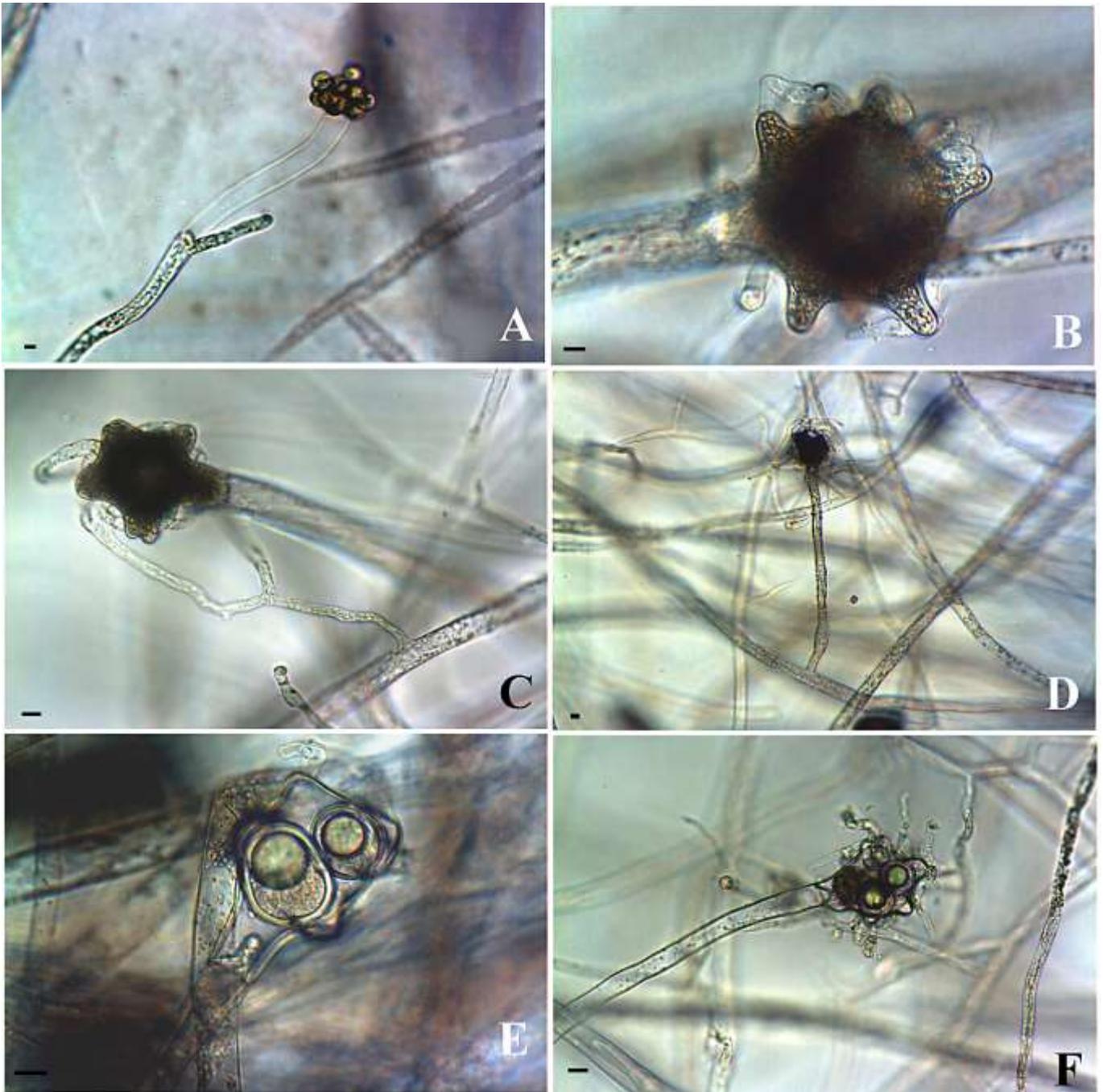


Figura 4 A-F. *Achlya crenulata* Ziegler – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Oogônio em formação com ornamentações; **C.** Anterídio díclino; **D.** Oogônio lateral com pedúnculo cumprido e anterídios díclinos; **E.** Oogônio com oósporos excêntricos; **F.** Oogônio com oosferas abortando. Barra = 10 μ m

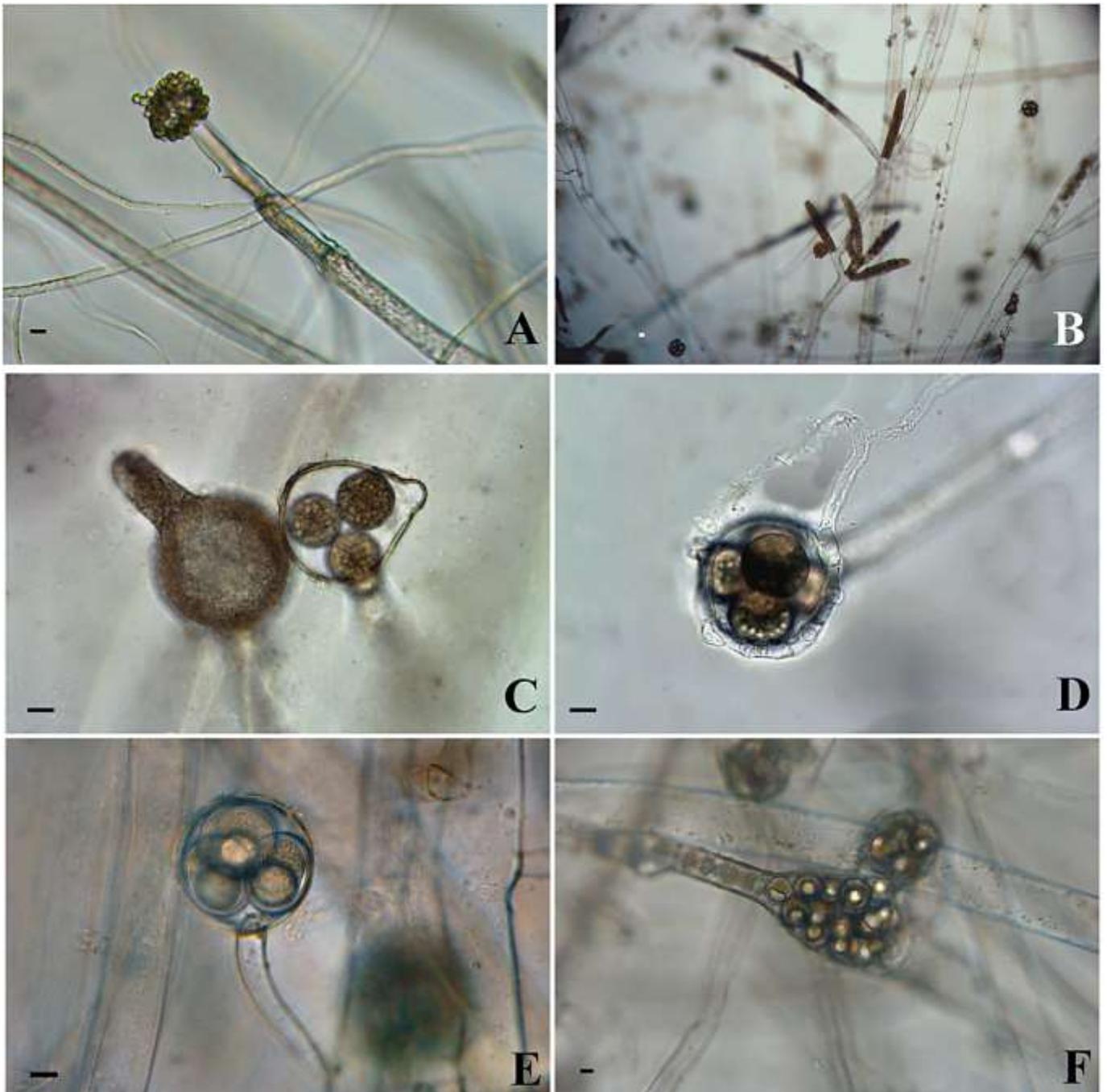
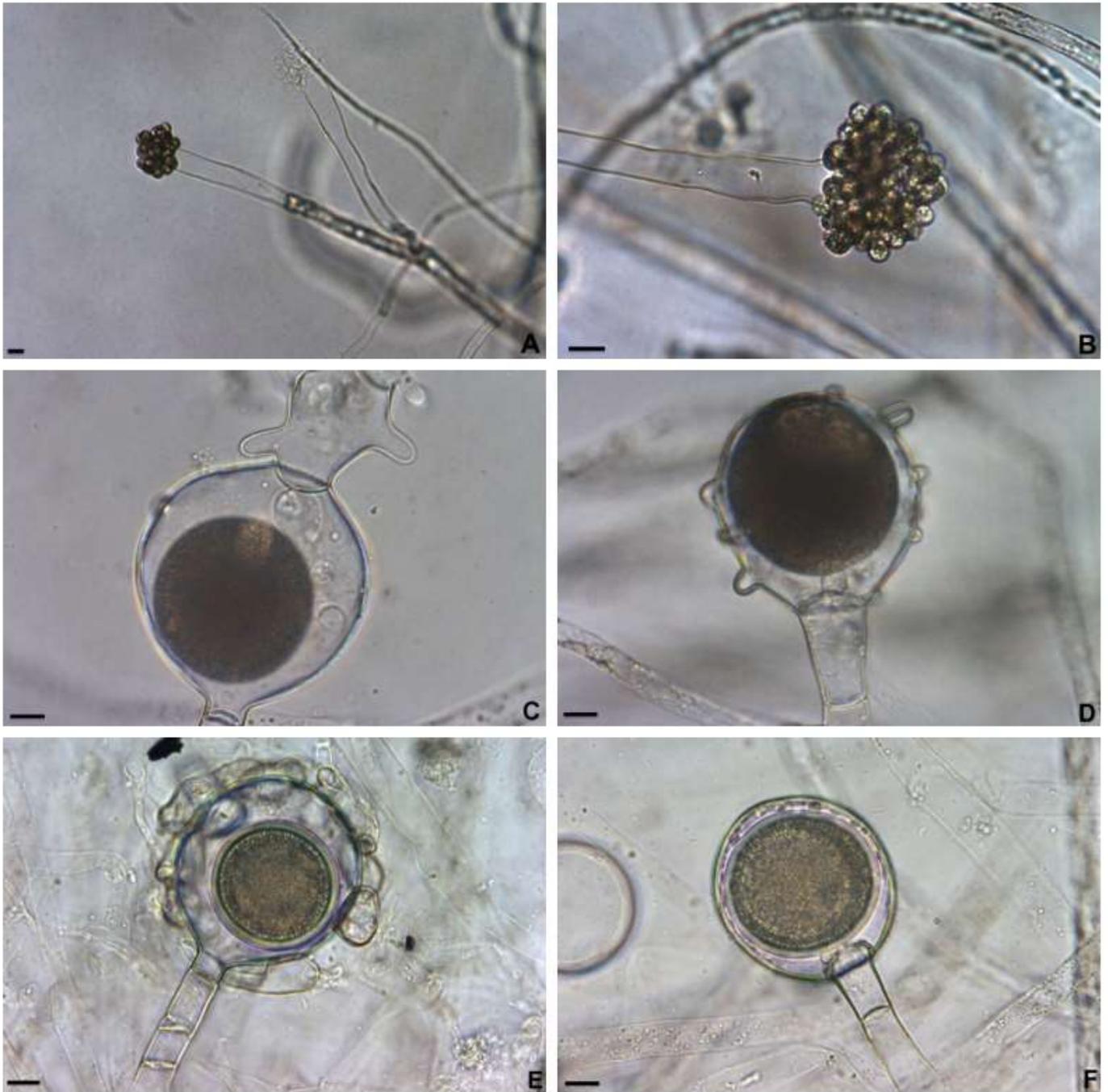


Figura 5 A-F. *Achlya flagellata* Coker – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação cimoso do zoosporângio; **C.** Oogônio com projeções na parede e oosferas não maturando; **D.** Anterídio ramificado envolvendo o oogônio com oosferas não maturando; **E.** Oogônio lateral com parede lisa e poros na parede, oósporos excêntricos; **F.** Vários oósporos excêntricos em oogônio intercalar. Barra = 10 μm



Fotos: Danilo Reis Gonçalves

Figura 6 A-F. *Achlya hypogyna* (Coker & Pemberton) T.W. Johnson & R.L. Seym. – **A.** e **B.** Zoosporângios com liberação dos zoósporos aclióide; **C.** **Oogônio** intercalar com célula anteridial ornamentada; **D.** Oogônio com ornamentação e anterídio hipógino; **E.** Anterídios enrolando no oogônio com um oósporo cêntrico; **F.** Oogônio liso com oósporo cêntrico. Barra = 10 μ m

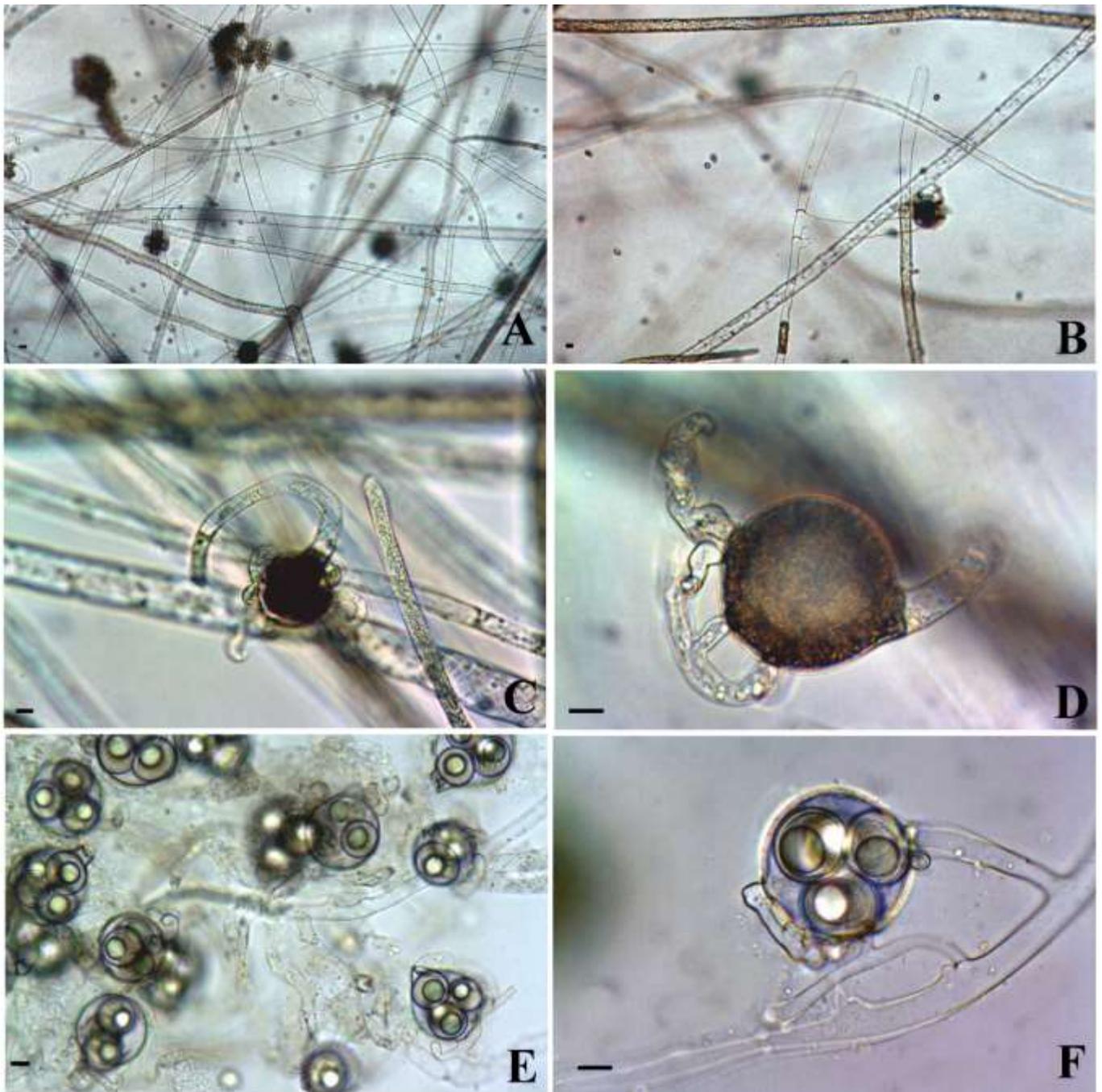


Figura 7 A-F. *Achlya orion* Coker & Couch – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação basipetalar do zoosporângio; **C.** Oogônio em formação com pedúnculo curvado; **D.** Oogônio com célula anteridial dividida; **E.** Visão geral da colônia; **F.** Oogônio com oósporos excêntricos e anterídio monóclino. Barra = 10 µm

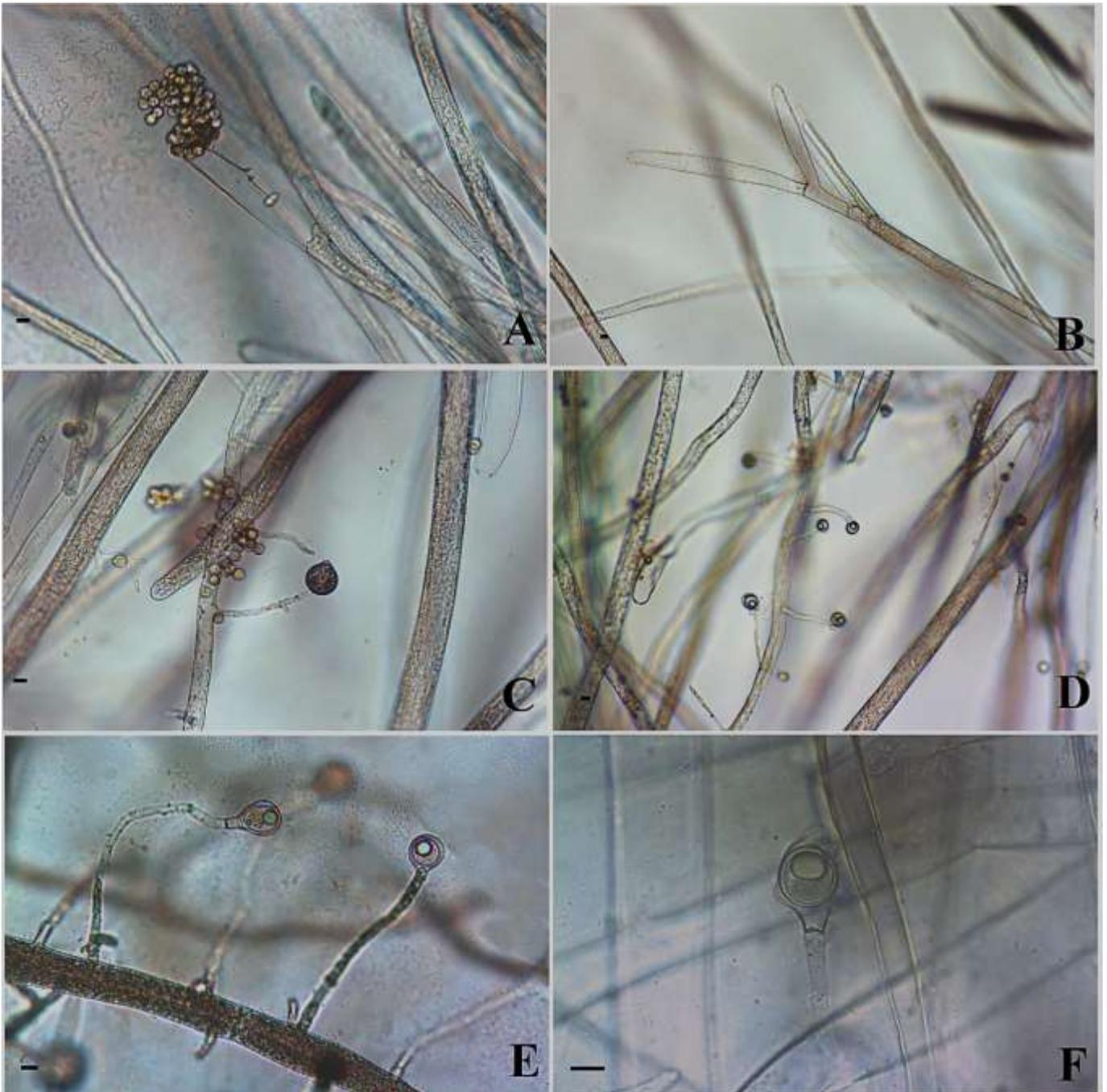


Figura 8 A-F. *Achlya oviparvula* A.L. Rogers & Beneke – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação simpodial do zoosporângio; **C.** Oogônio em formação; **D.** Visão geral da colônia; **E.** Oogônio com um ósporo e pedúnculo longo; **F.** Oogônio com ósporo excêntrico. Barra = 10 µm

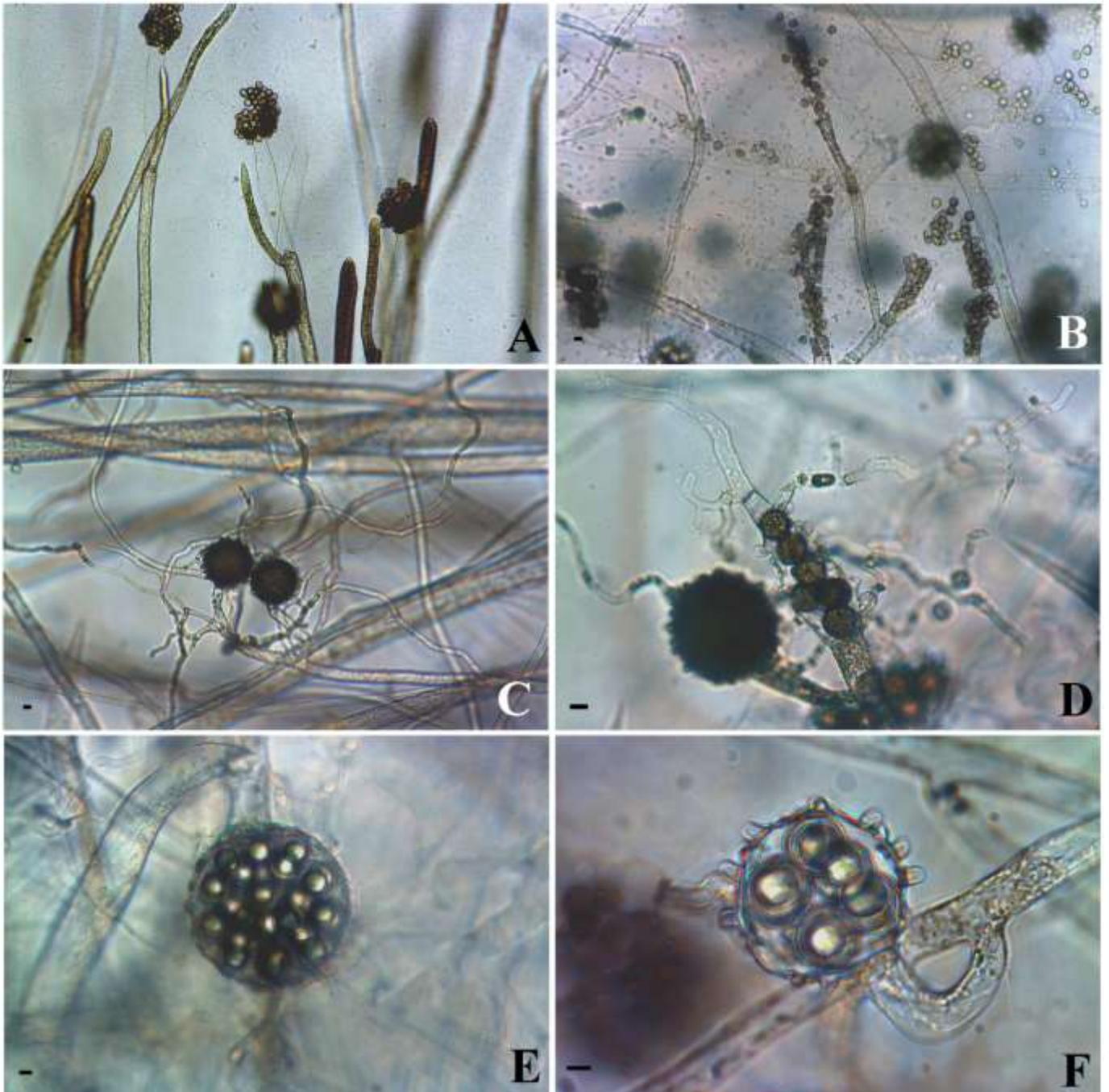


Figura 9 A-F. *Achlya primoachlya* (Coker & Couch) T.W. Johnson & R.L. Seym. – **A.** Zoosporângios primários com liberação aclióide; **B.** Zoosporângios secundários com liberação traustothecóide e dictiíide; **C.** Oogônios e anterídios ramificados em formação; **D.** Oogônio intercalar com oosferas; **E.** Oogônio com mais de 20 oósporos excêntricos, esféricos; **F.** Oogônio lateral com ornamentações truncadas e papiladas, oósporos excêntricos Barra = 10 μm

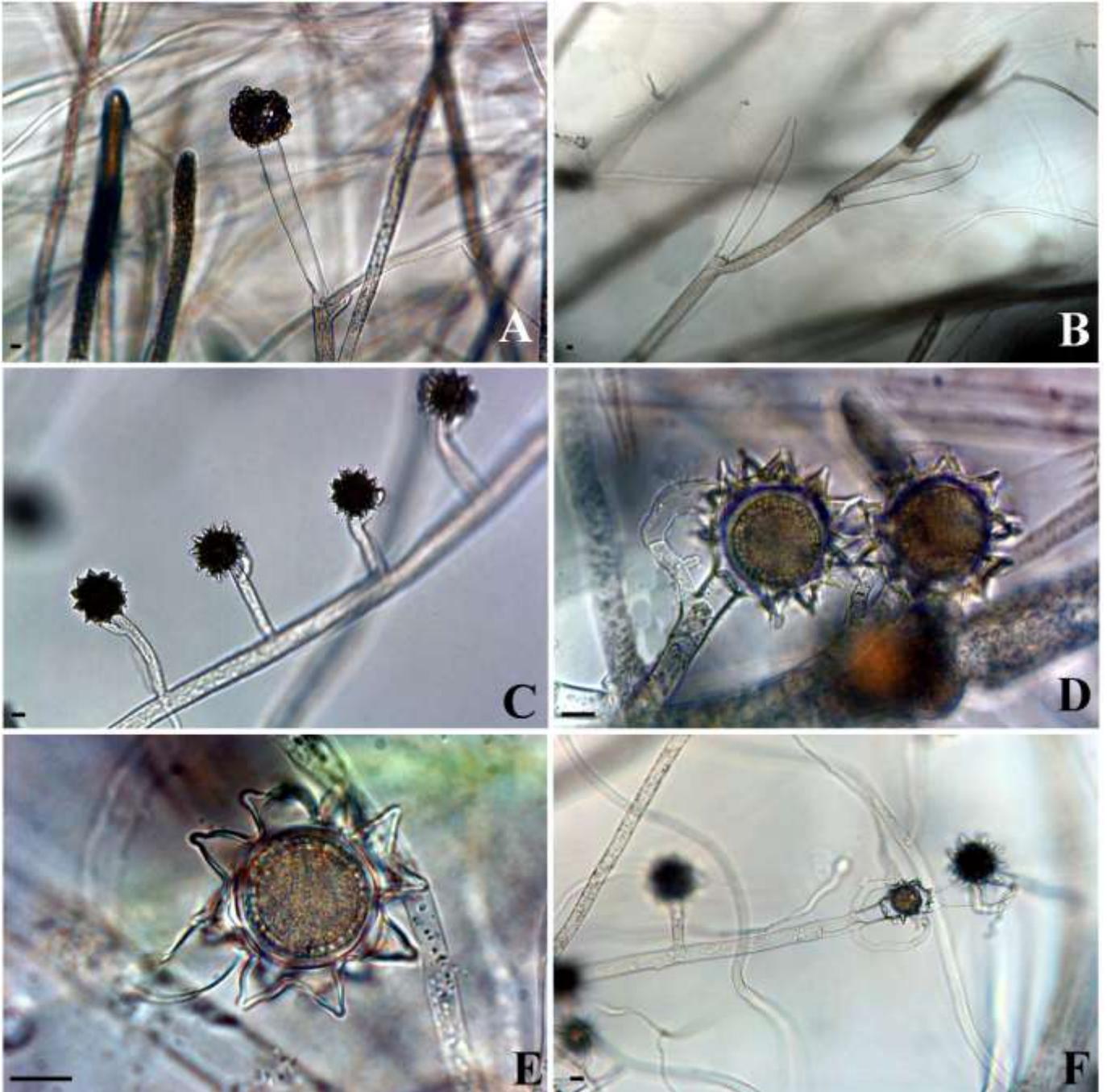


Figura 10 A-F. *Achlya radiosa* Maurizio – **A.** Zoosporângio com liberação aclióide; **B.** Renovação simpodial dos zoosporângios; **C.** Oogônios e anterídios em formação; **D.** Oogônio com anterídio andrógino; **E.** Oogônio com oósporo subcêntrico e ornamentação mamiforme; **F.** Oogônio e anterídio em zoosporângio vazio. Barra = 10 μ m

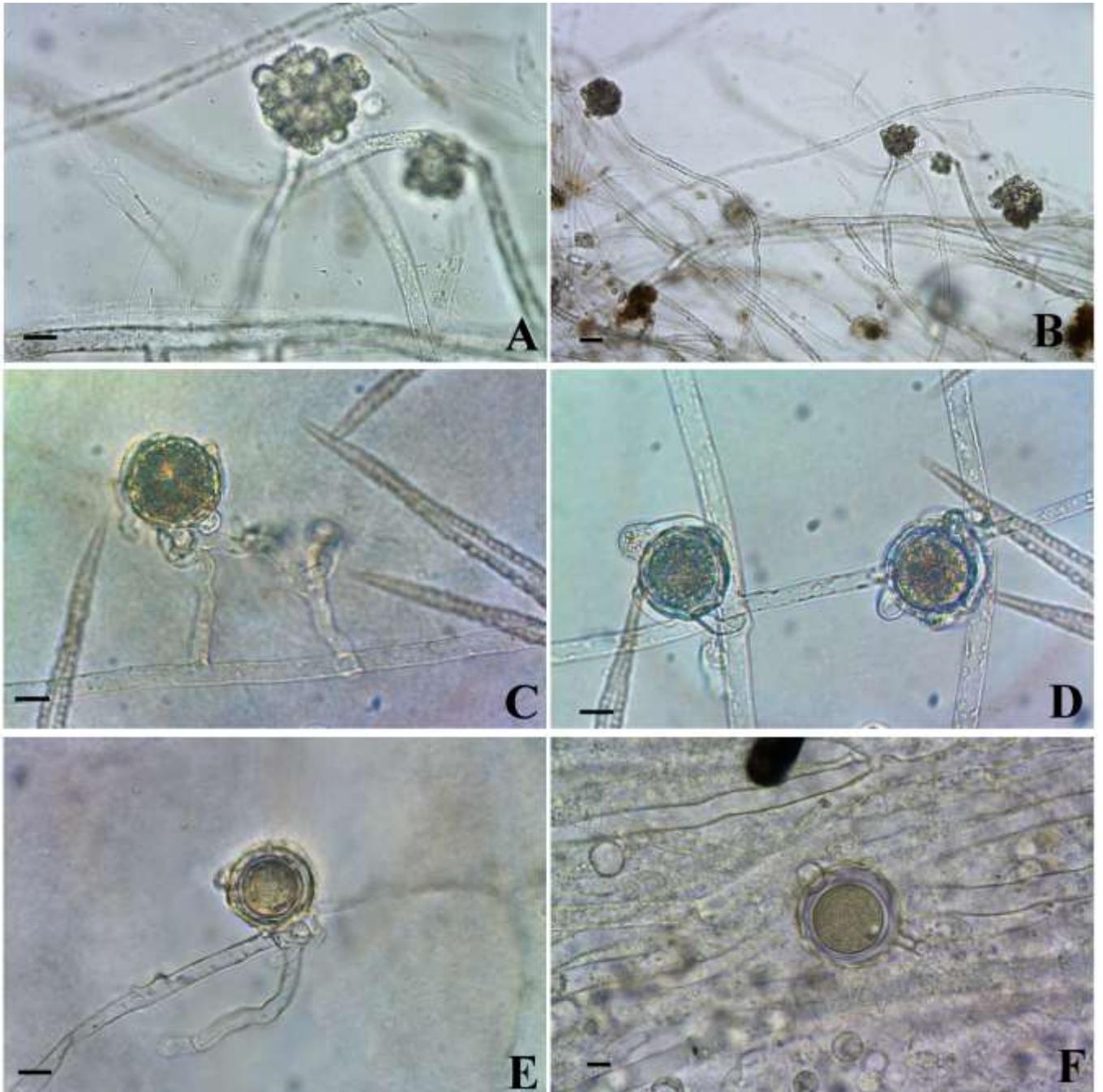


Figura 11 A-F. *Aphanomyces cladogamus* Drechsler – **A e B.** Liberação aclióide dos zoósporos; **C.** Oogônio com anterídio monóclino; **D e E.** Anterídio envolto ao oogônio; **F.** Oogônio com oósporo. Barra = 10 µm

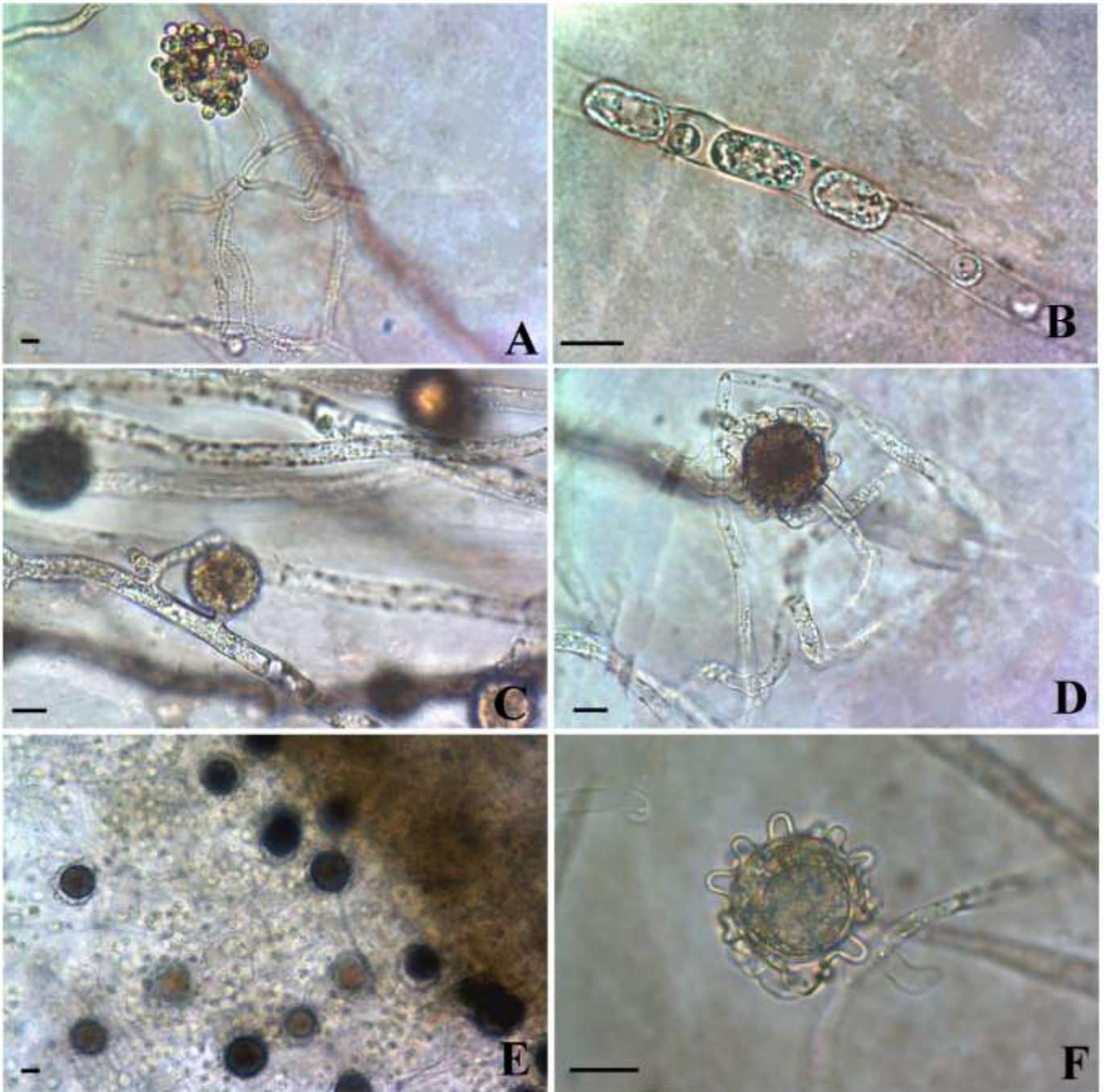


Figura 12 A-F. *Aphanomyces stellatus* de Bary – **A.** Zoosporângio pouco diferenciado do micélio e liberação aclióide dos zoósporos; **B.** Formação dos zoósporos dentro do micélio; **C.** Formação de oogônio e anterídio; **D.** Oogônio ornamentado com anterídio ramificado; **E.** Visão geral da colônia com crescimento em ecdise de cobra; **F.** Oogônio com ornamentações papiladas e arranjo das gotículas lipídicas subcêntrica. Barra = 10 μ m

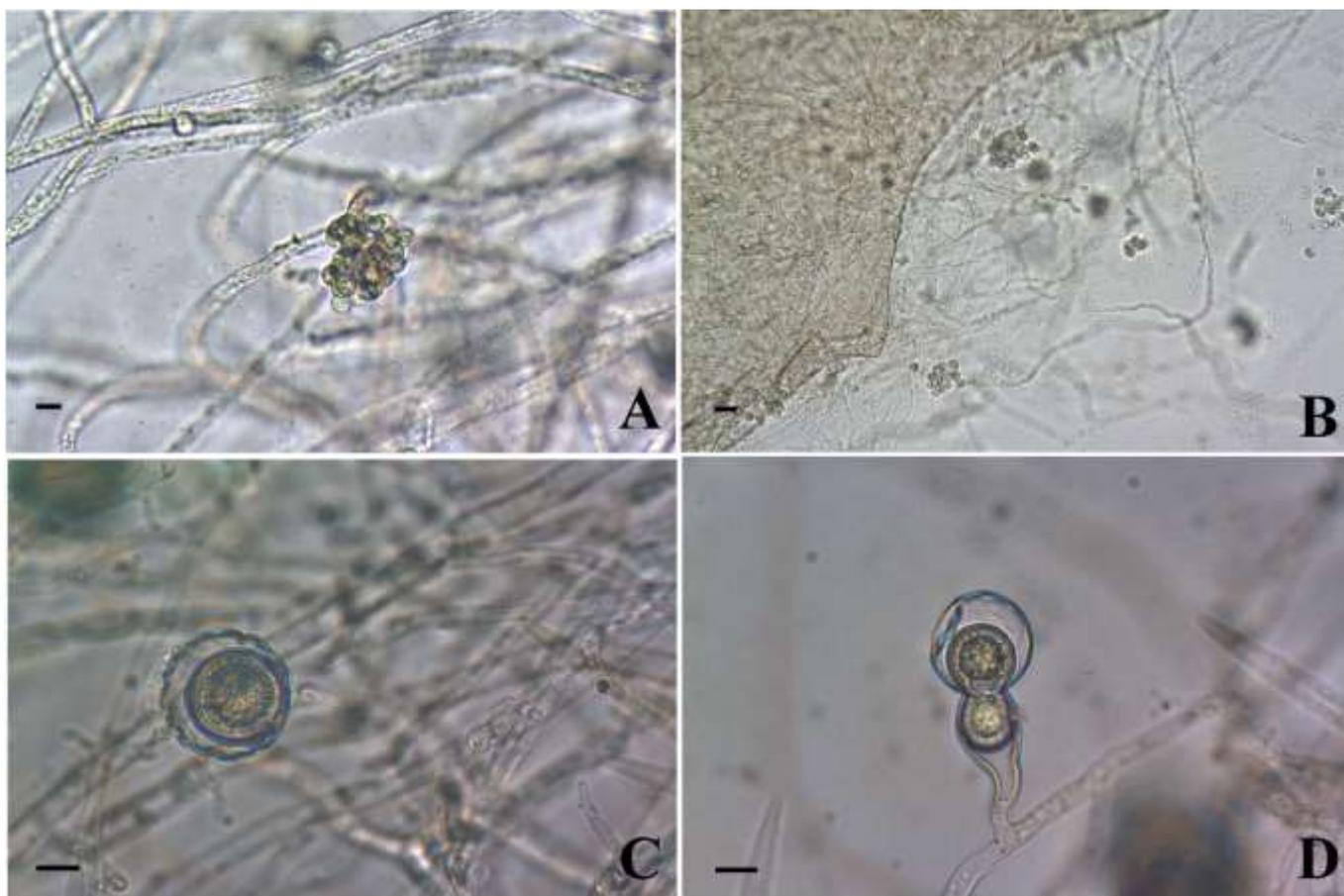


Figura 13 A-D. *Aphanomyces* sp.1 – **A.** Liberação acióide dos zoósporos; **B.** Crescimento da cultura em ecdisse de cobra; **C.** Oogônio com parede abaulada; **D.** Oogônio e oósporo alongado. Barra = 10 μ m

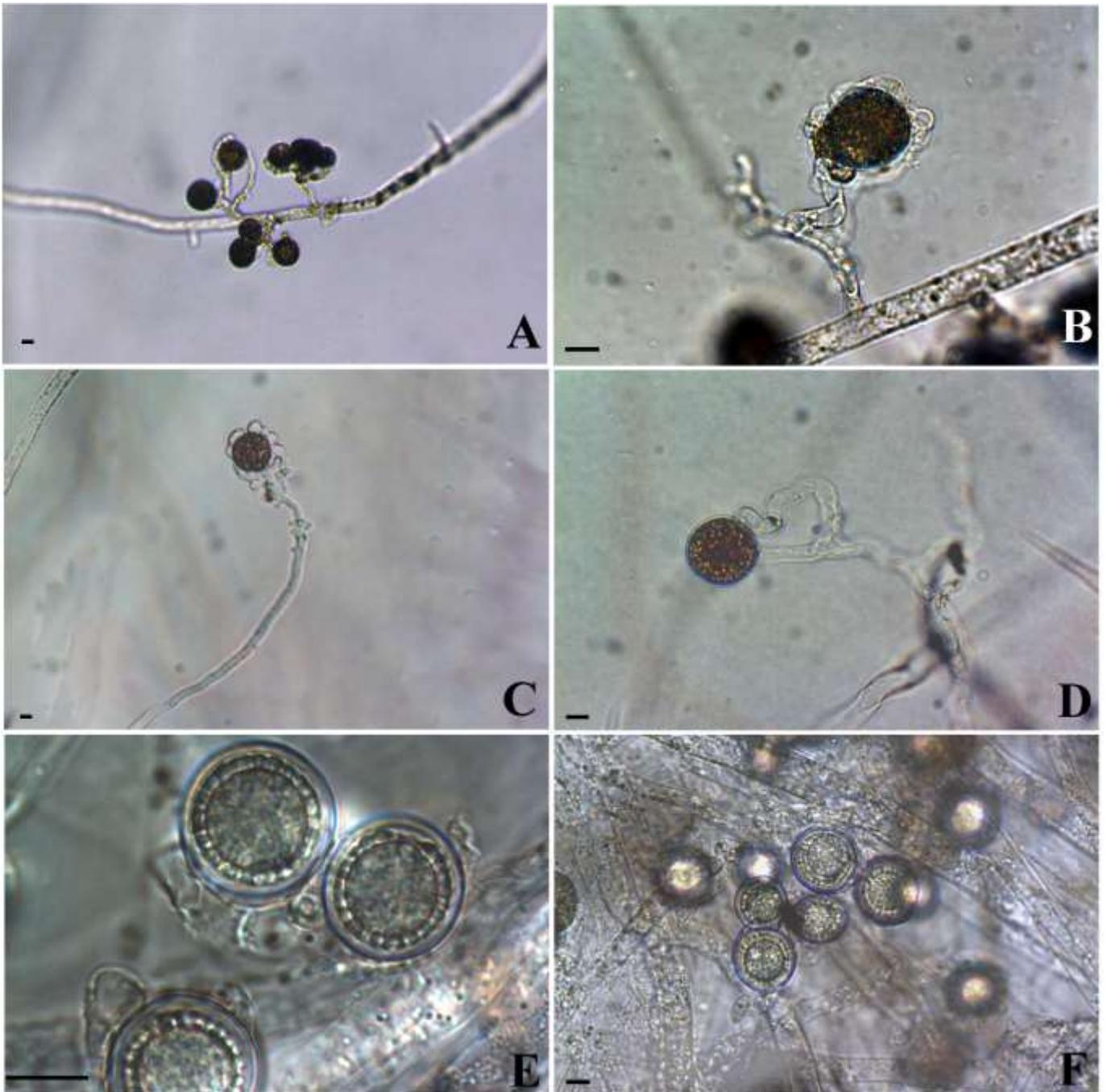


Figura 14 A-F. *Aplanopsis terrestris* Höhnk – **A.** Oogônios com pedúnculos ramificados; **B.** Oogônio lateral e anterídio andrógino; **C** e **D.** Oogônio e anterídio; **E.** Oogônio com oósporo cêntrico; **F.** Oogônio com oósporo subcêntrico. Barra = 10 μ m

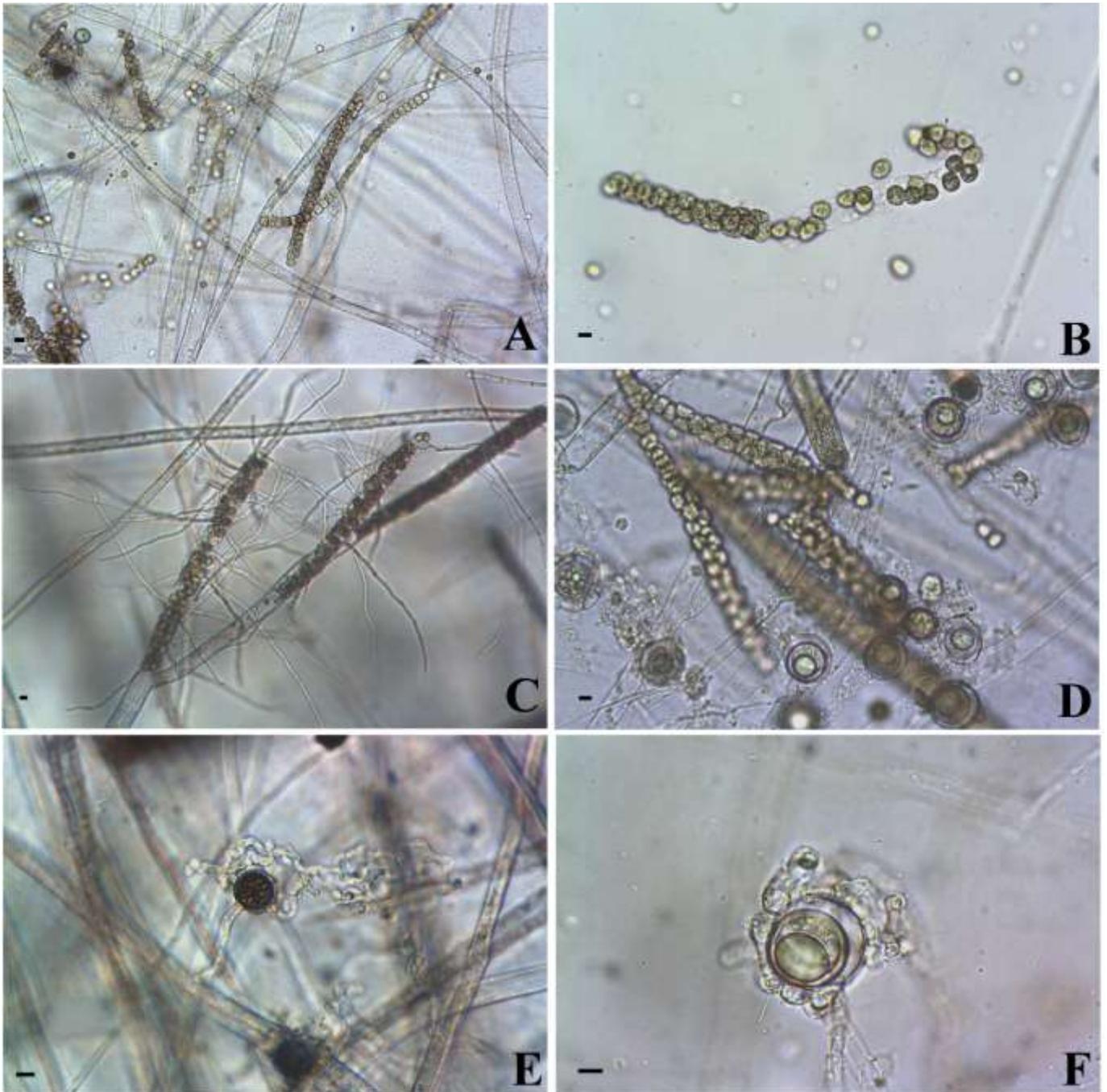


Figura 15 A-F. *Brevilegnia longicaulis* T.W. Johnson – **A.** Visão geral da colônia; **B.** Liberação dos zoósporos dictióide; **C.** Liberação dos zoósporos aplanóide; **D.** Zoosporângios e oogônios; **E.** Oogônio em formação e anterídio díclino; **F.** Oogônio com oósporo excêntrico e anterídios. Barra = 10 μ m



Fotos: Cristiane Nascimento

Figura 16 A-D. *Brevilegnia minutandra* Höhnk – A e B. Zoósporos formados em zoosporângios; C e D. Oogônios com um oósporo excêntrico. Barra = 10 μ m

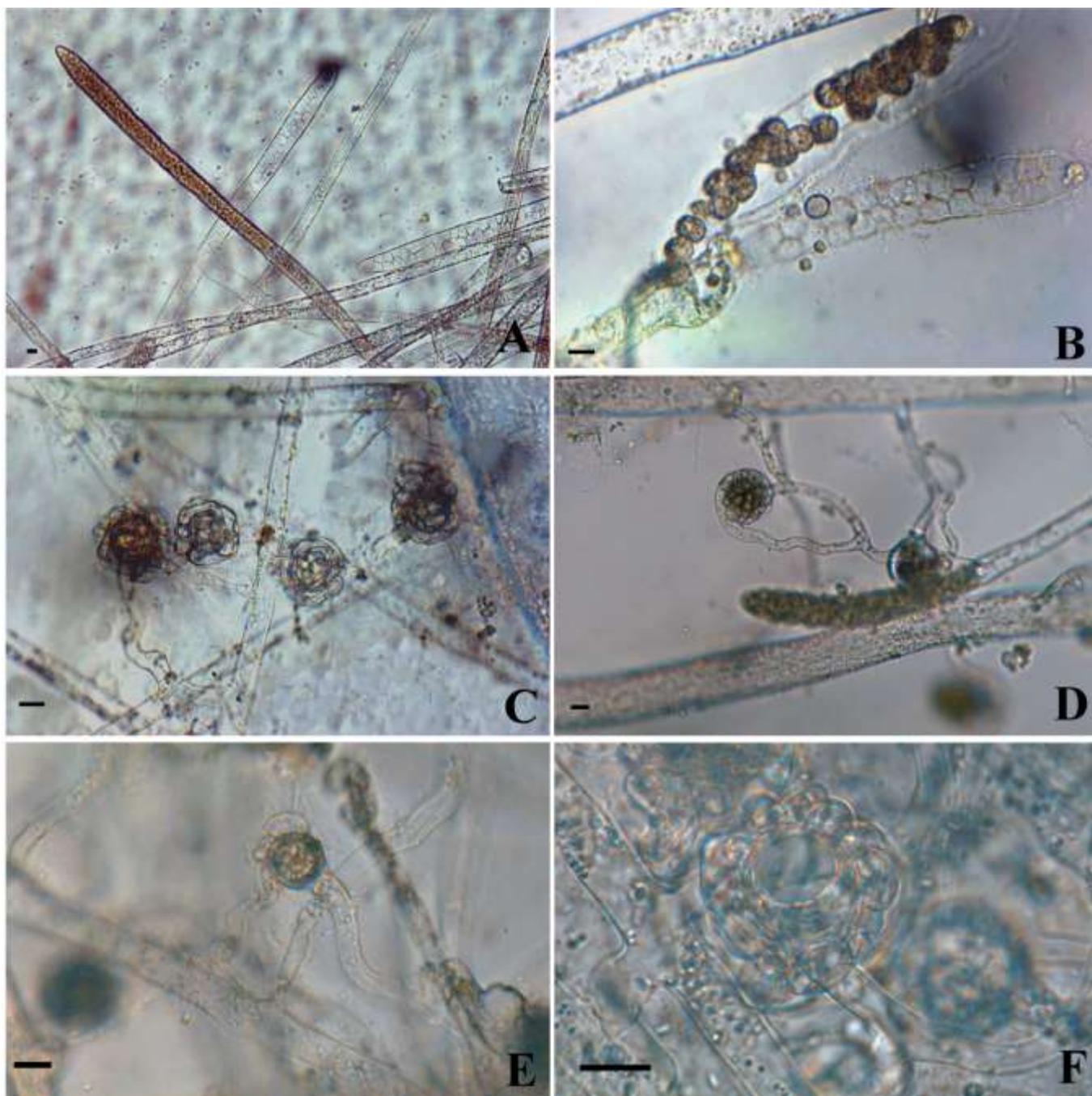


Figura 17 A-F. *Dictyuchus pseudodictyon* Coker & Braxton – **A.** Zoosporângio vazio e em formação; **B.** Renovação dos zoosporângios; **C.** Oogônios e anterídios; **D.** Oogônio com anterídio andrógino; **E.** Oogônio com anterídio díclino; **F.** Oogônio com oósporo excêntrico. Barra = 10 μ m

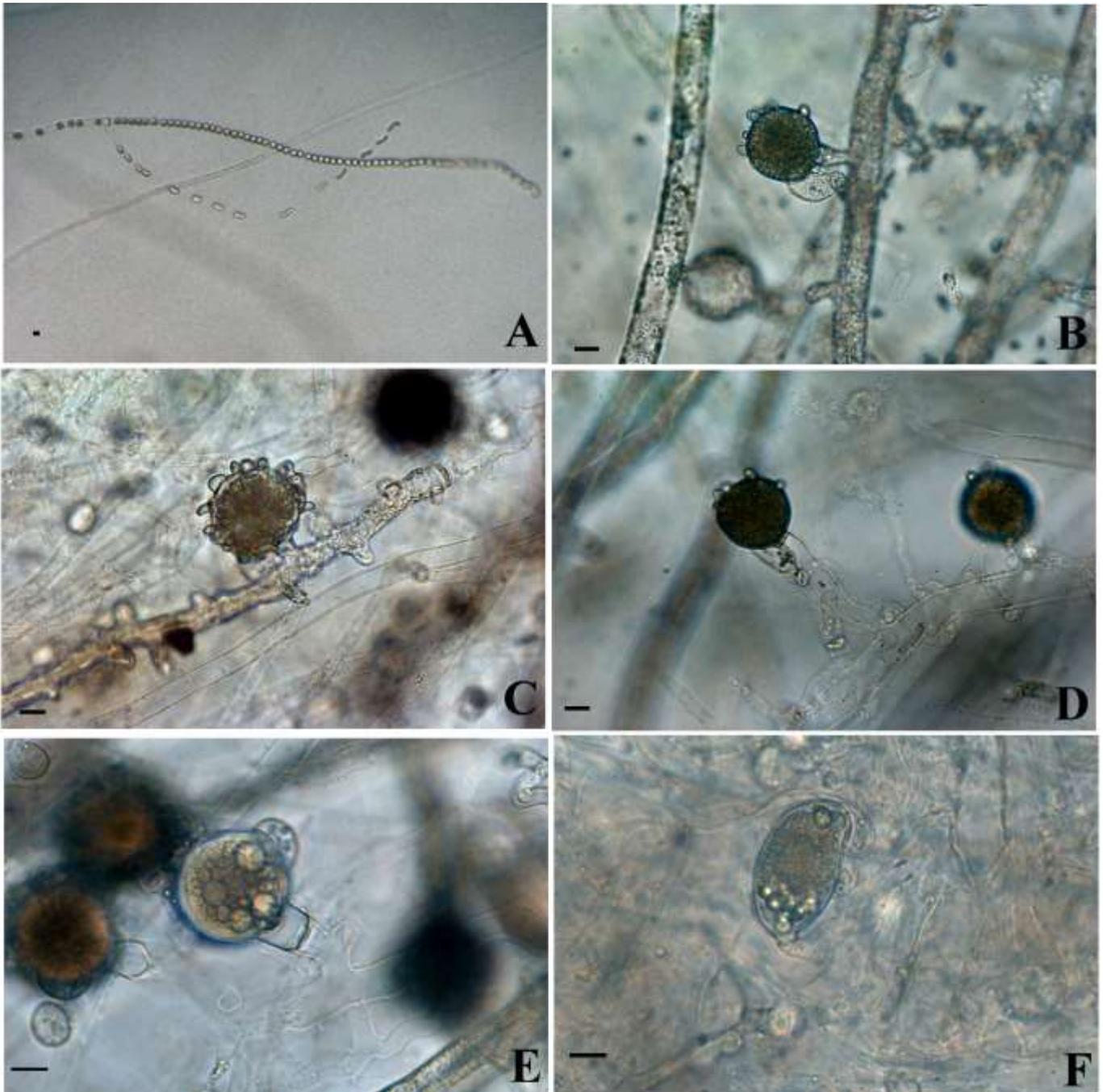


Figura 18 A-F. *Leptolegnia chapmanii* R.L. Seymour – **A.** Formação dos zoósporos pelos zoosporângios; **B.** Oogônio com anterídio monóclino; **C.** Oogônio lateral com ornamentações; **D.** Oogônio com anterídio monóclino enrolando no pedúnculo do oogônio; **E.** e **F.** Oósporo com formação de gotículas lipídicas subexcêntrica. Barra = 10 μm

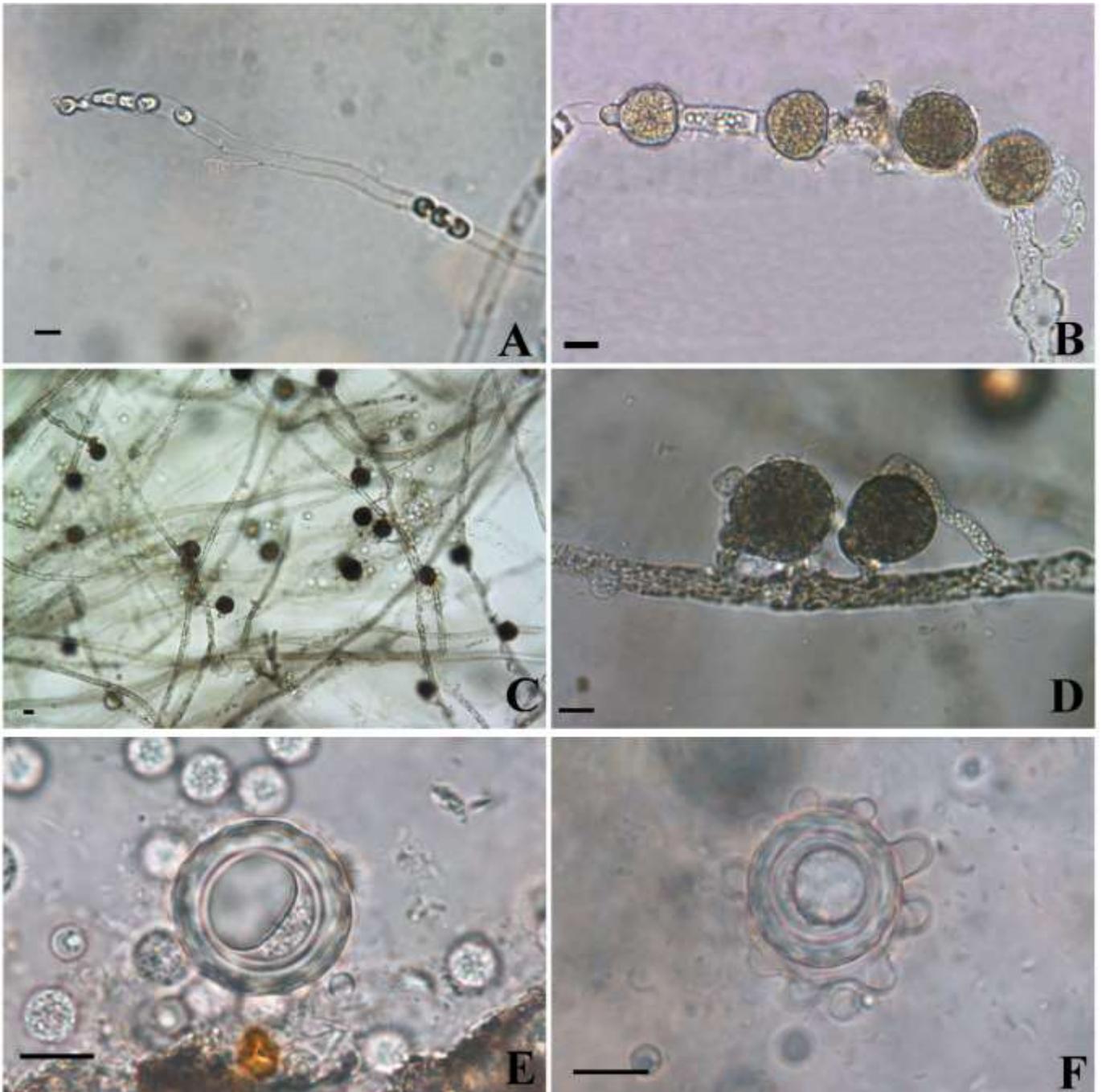


Figura 19 A-F. *Leptolegnia eccentrica* Coker – **A.** Zoosporângio e zoósporos em formação dentro do micélio; **B.** Oogônios catenulados em formação; **C.** Visão geral da colônia; **D.** Oogônios em formação e anterídios monóclinos; **E** Oogônio com oósporo excêntrico; **F.** Oogônio ornamentado com oósporo excêntrico. Barra = 10 μm

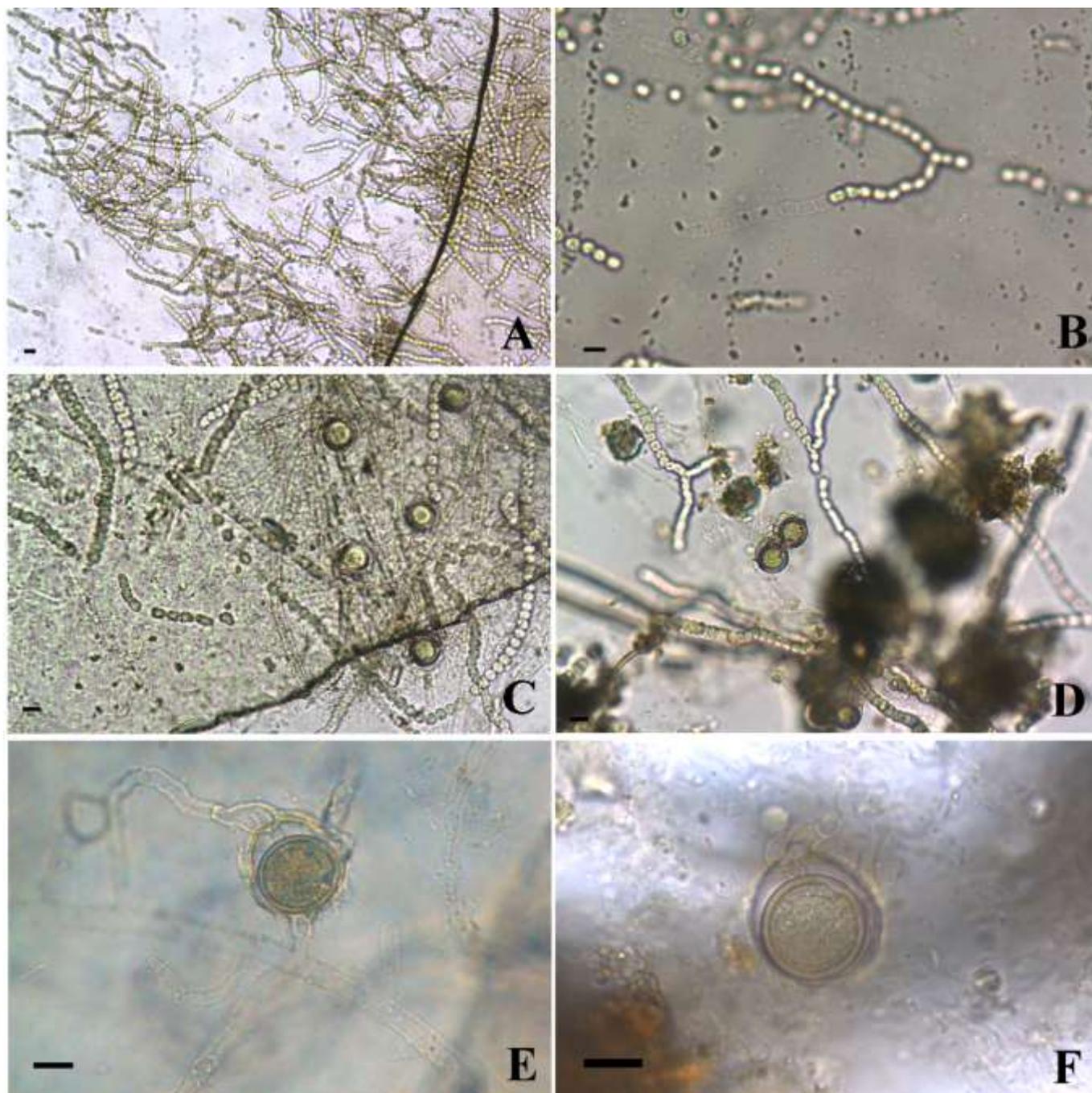


Figura 20 A-F. *Phragmosporangium uniseriatum* R.L. Seym. – **A.** Zoosporângios formados a partir do micélio; **B.** Liberação dos zoósporos; **C.** Visão geral da colônia em ecdise de cobra; **D.** Zoosporângios e oogônios; **E.** Oogônio com anterídio monóclino e tubo de fertilização; **F.** Oogônio com anterídio e tubo de fertilização. Barra = 10 μ m

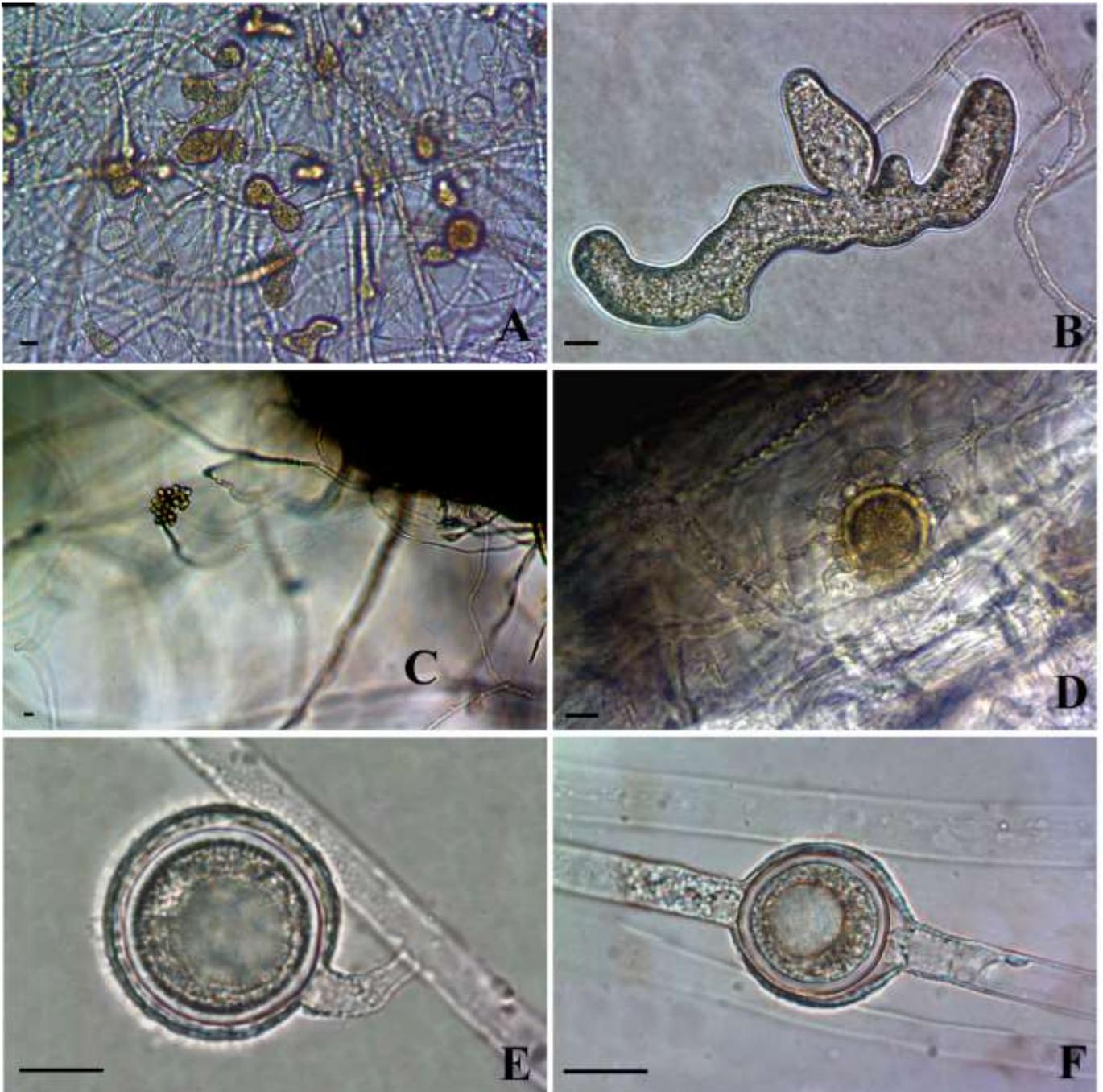


Figura 21 A-F. *Plectospira myriandra* Drechsler – **A.** Colônia com vários zoosporângios lobulares em formação; **B.** Detalhe de um zoosporângio irregular; **C.** Liberação aclióide dos zoósporos; **D.** Oogônio em palha de milho envolto por anterídios; **E.** Oogônio com pedúnculo curto e oósporo com gotícula lipídica subcêntrica; **F.** Oogônio intercalar. Barra = 10 μ m

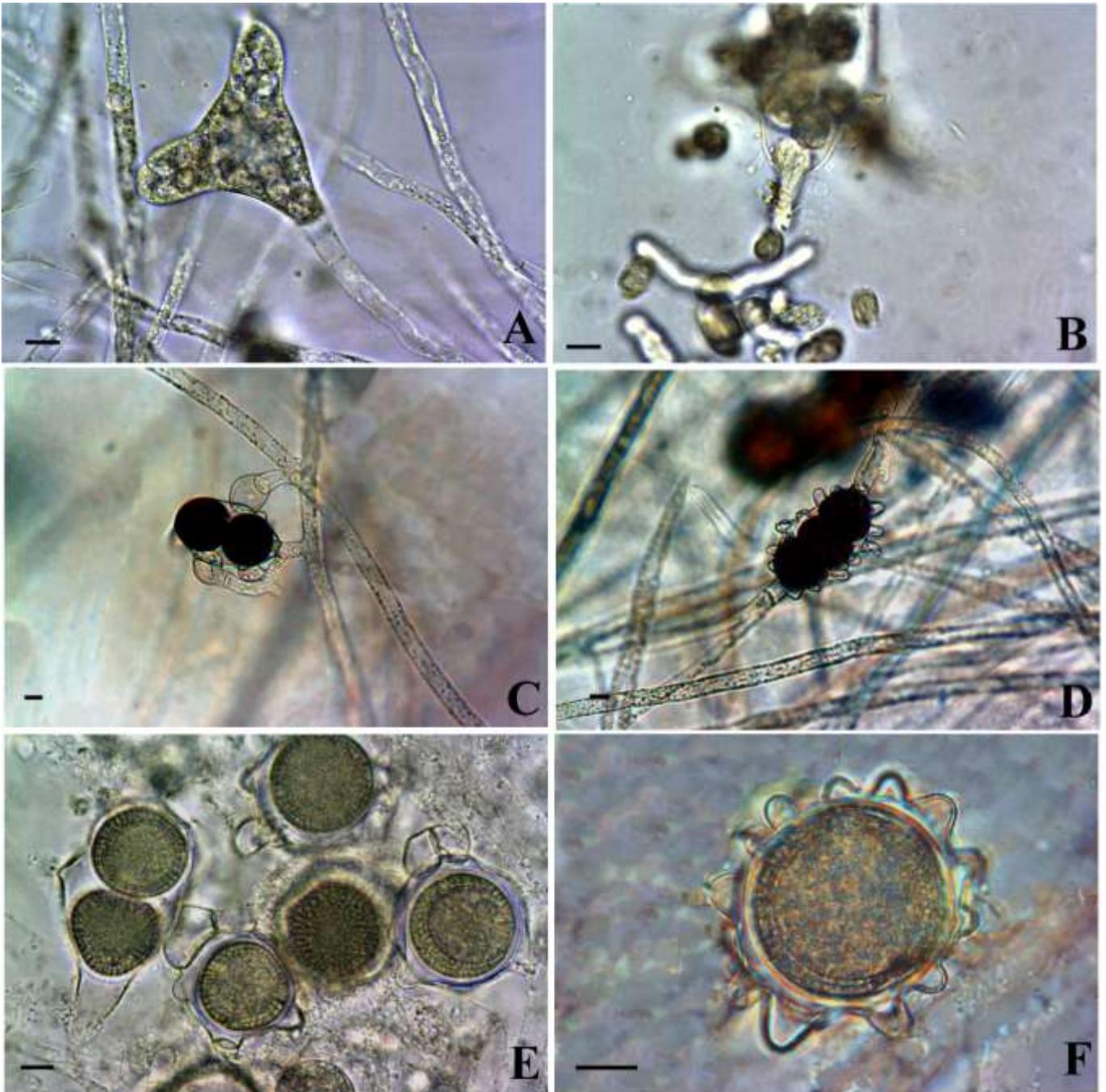


Figura 22 A-F. *Pythiopsis irregularis* R.L. Seym. – **A.** Zoosporângio irregular em formação; **B.** Liberação dos zoósporos; **C.** Oogônio em formação com anterídio monóclino e andrógino; **D.** Oogônio intercalar com ornamentações papiladas e tuberculadas; **E.** Oogônios com oósporos subcêntricos; **F.** Oogônio com oósporo subcêntrico e ornamentações papiladas e tuberculadas. Barra = 10 μm

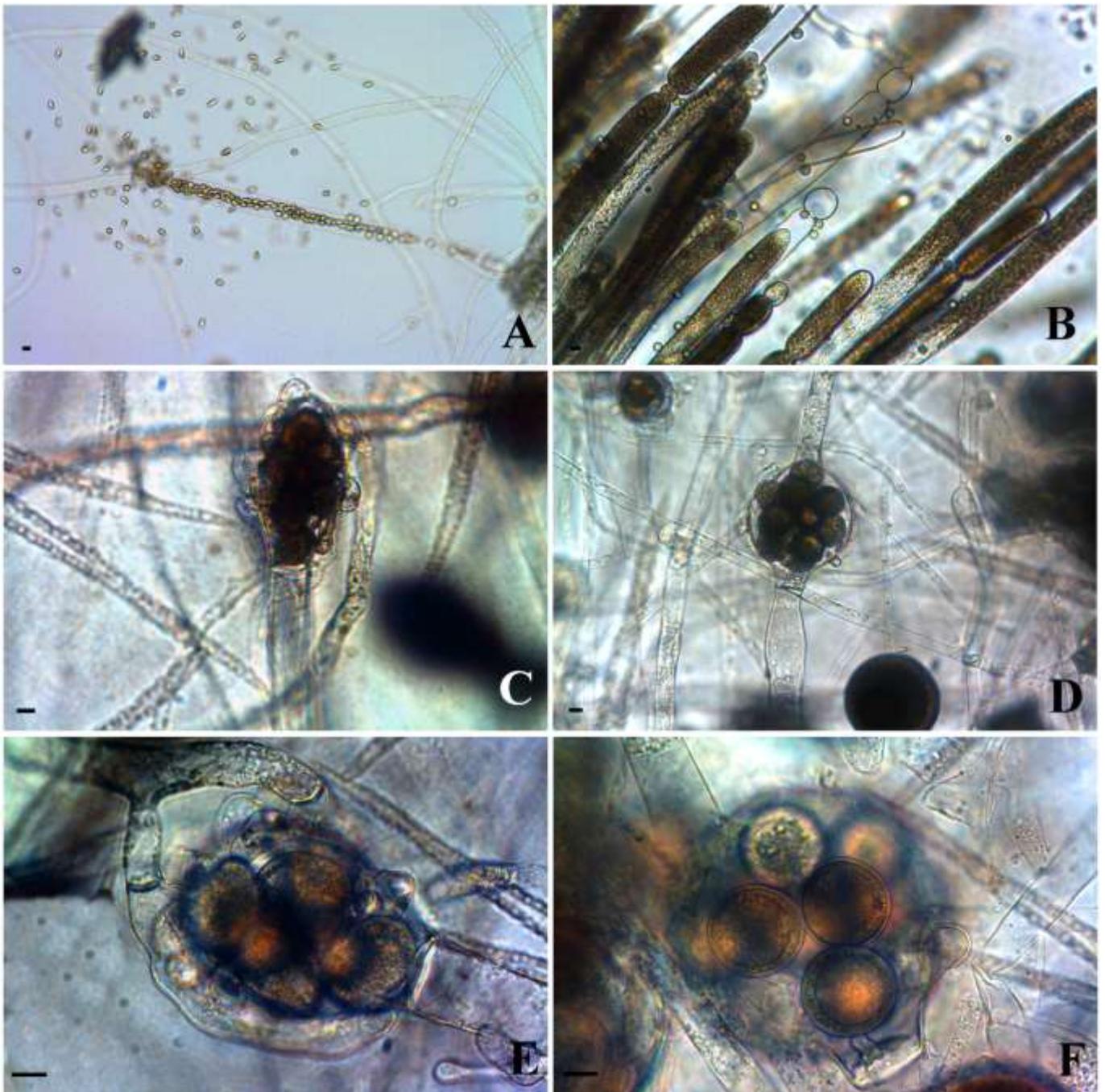
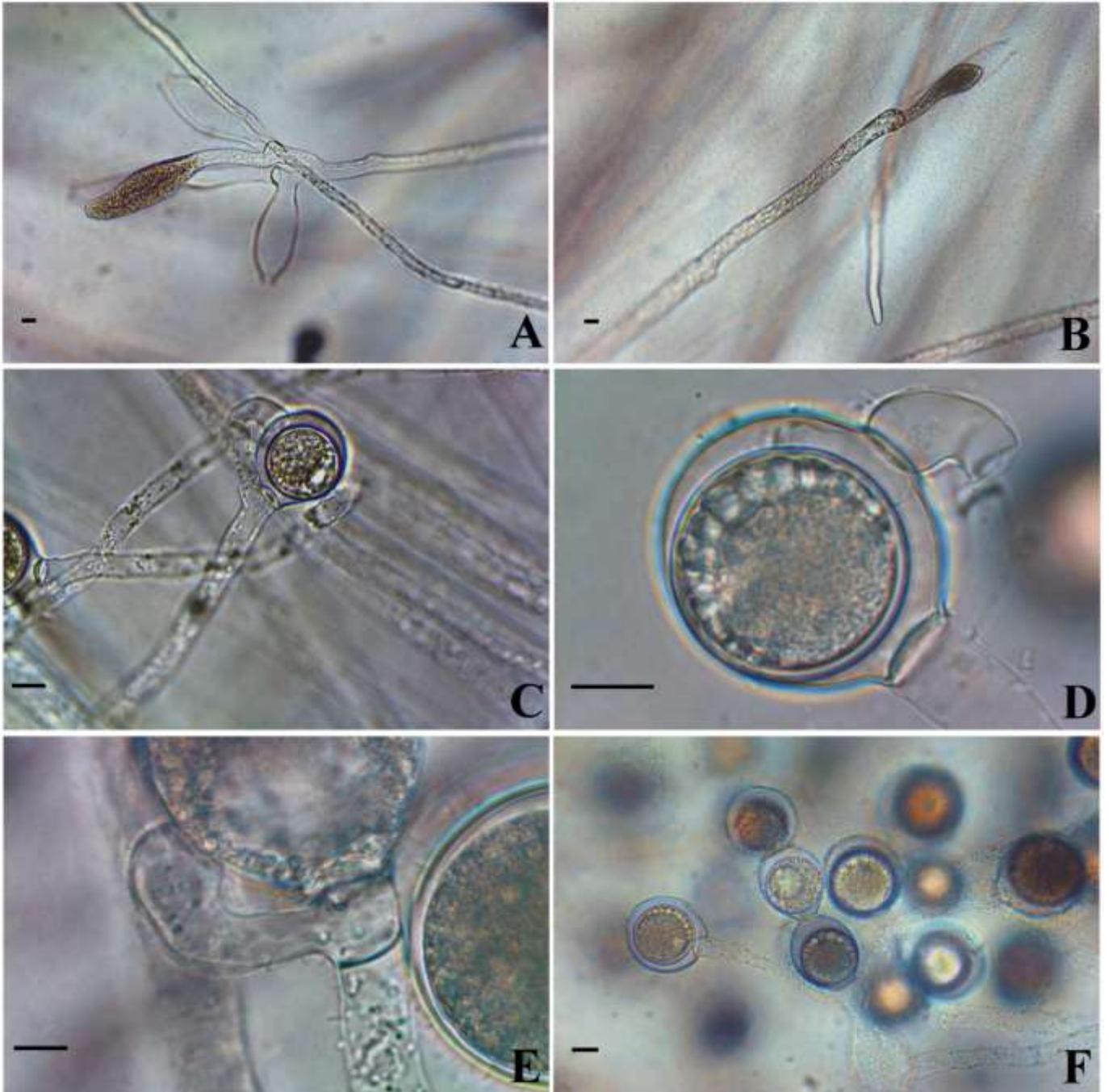


Figura 23 A-F. *Saprolegnia aenigmatica* Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo – **A.** Zoosporângio com liberação dos zoósporos saprolegnióide; **B.** Zoosporângios com renovação por proliferação interna; **C.** Oogônio em formação e anterídio díclino enrolando no pedúnculo do oogônio; **D.** Oogônio intercalar; **E.** Oogônio e anterídios; **F.** Oósporos subcêntricos. Barra = 10 μ m

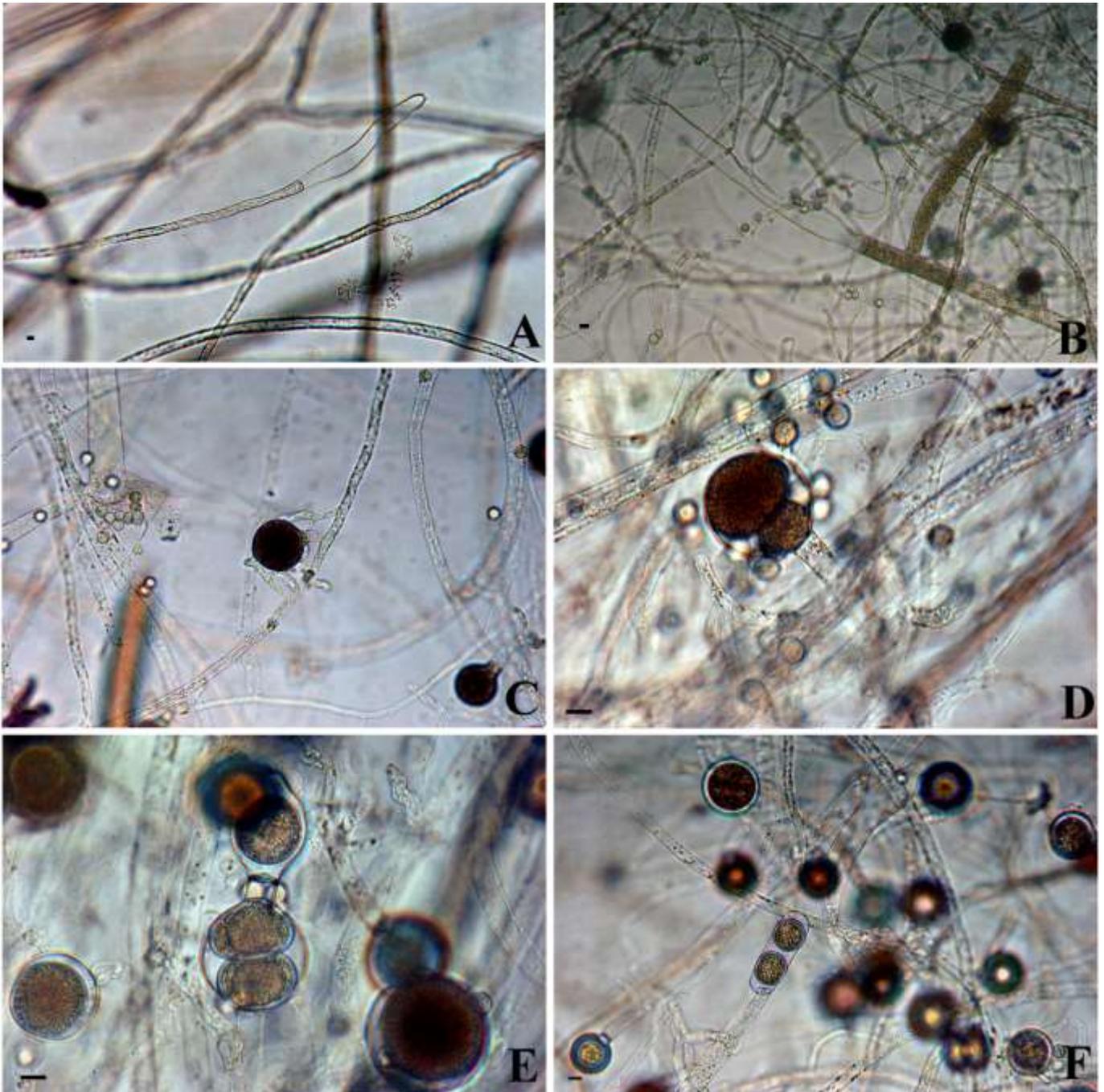


Figura 24 A-F. *Saprolegnia ferax* (Gruith) Kütz – **A.** Zoosporângio com renovação por proliferação interna; **B.** Oogônio em formação com pedúnculo contorcido; **C.** Oogônio séssil com poros; **D.** Oogônio com anterídio díclino; **E.** Oogônio com um oósporo subcêntrico; **F.** Oogônio com pedúnculo curto e oósporos subcêntricos. Barra = 10 μ m



Fotos: Danilo Reis Gonçalves

Figura 25 A-F. *Saprolegnia semihypogyna* S. Inaba & Tokum. – **A.** Zoosporângio com renovação simpodial; **B.** Renovação do zoosporângio por proliferação interna; **C.** Anterídio andrógino e oogônio com oósporo subexcêntrico; **D.** Oogônio com oósporo subexcêntrico e anterídio andrógino com tubo de fertilização; **E.** Anterídio semi-hipógino; **F.** Oogônios catenulados. Barra = 10 μ m



Fotos: Gustavo Henrique Jerônimo

Figura 26 A-F. *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) Seym. – **A.** Zoosporângio vazio; **B.** Renovação do zoosporângio; **C.** Oogônio lateral com anterídio monóclino; **D.** Oogônio com duas oosferas em formação; **E.** Oogônios subcêtricos, catenulados; **F.** Oogônio dentro de zoosporângio vazio. Barra = 10 μ m

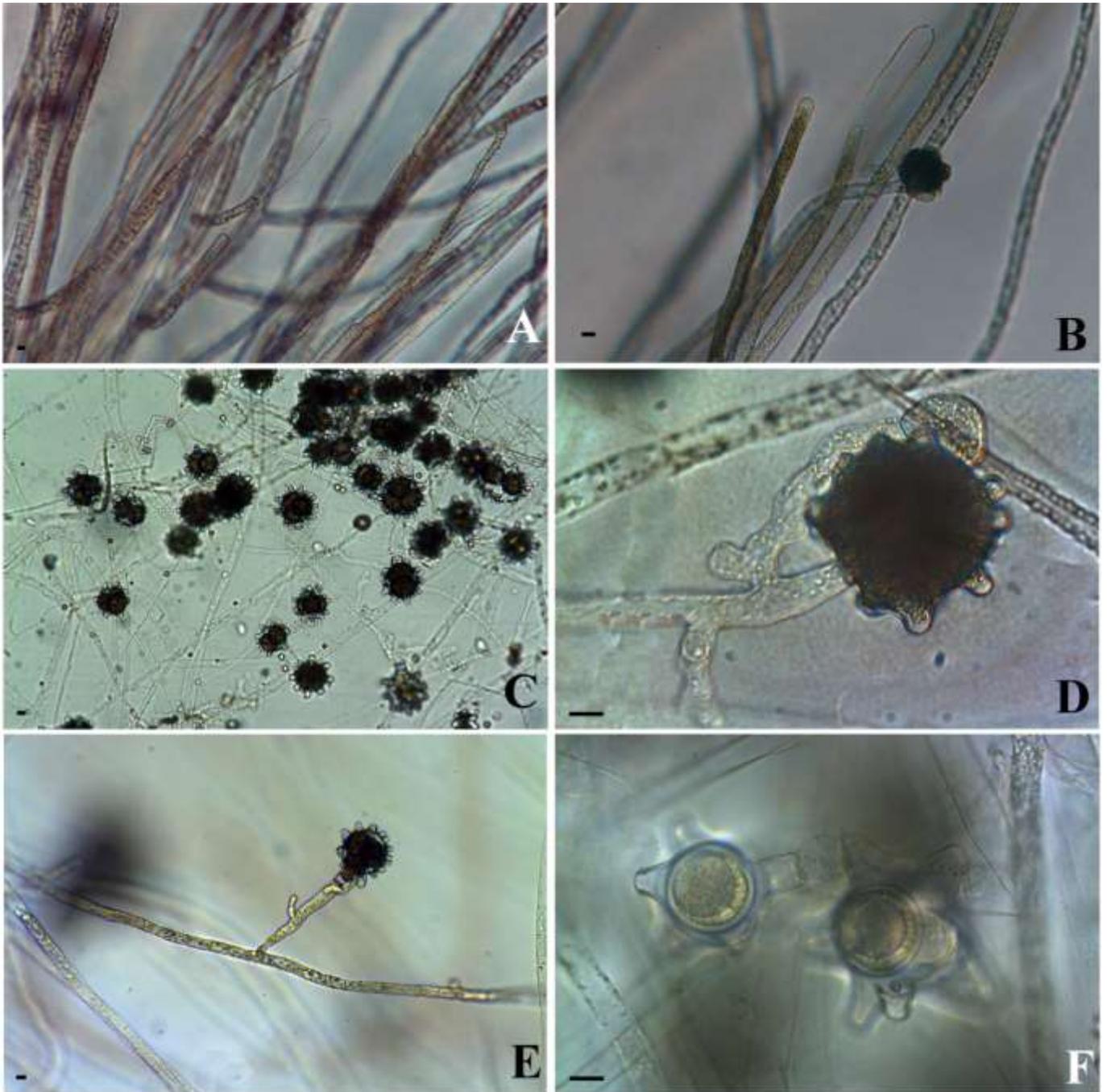


Figura 27 A-F. *Saprolegnia truncata* R.L. Seym. – **A.** Zoosporângios vazios; **B.** zoosporângio com renovação por proliferação interna; **C.** Visão geral da colônia; **D.** Oogônio em formação com anterídio andrógino; **E.** Oogônio lateral ornamentado com oosferas em formação; **F.** Oósporos subcêntricos. Barra = 10 μ m

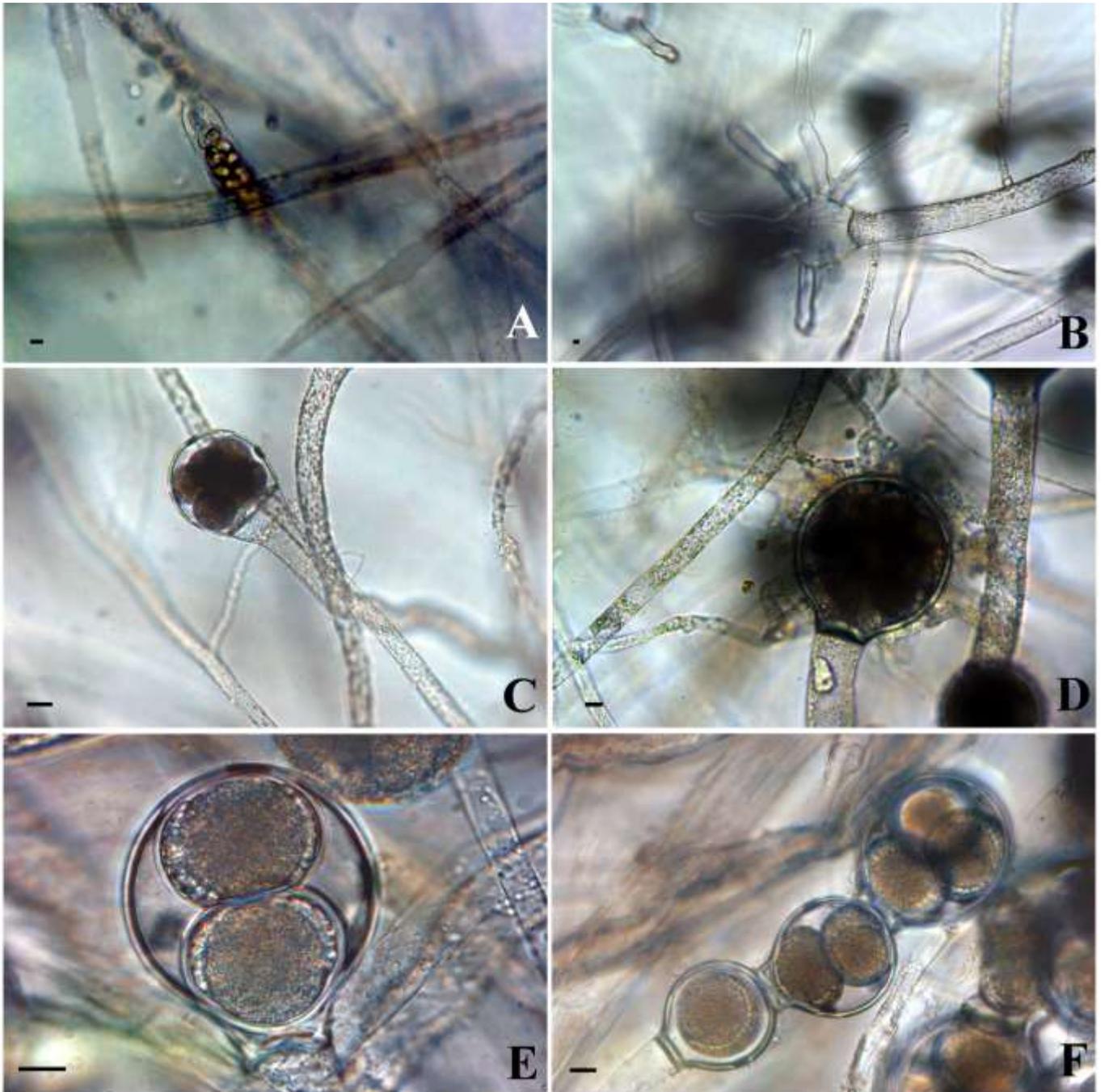


Figura 28 A-F. *Saprolegnia milanezii* sp. nov. – **A.** Zoosporângio primário com liberação saprolegnióide e renovação por proliferação interna; **B.** Zoosporângio secundário esférico e formação de vários tubos de liberação; **C.** Oogônio com pedúnculo alargado próximo ao septo do oogônio; **D.** Vários anterídios ao redor do oogônio; **E.** Oogônio com dois oósporos subcêntricos; **F.** Oogônios catenulados com oósporos subcêntricos. Barra = 10 μ m

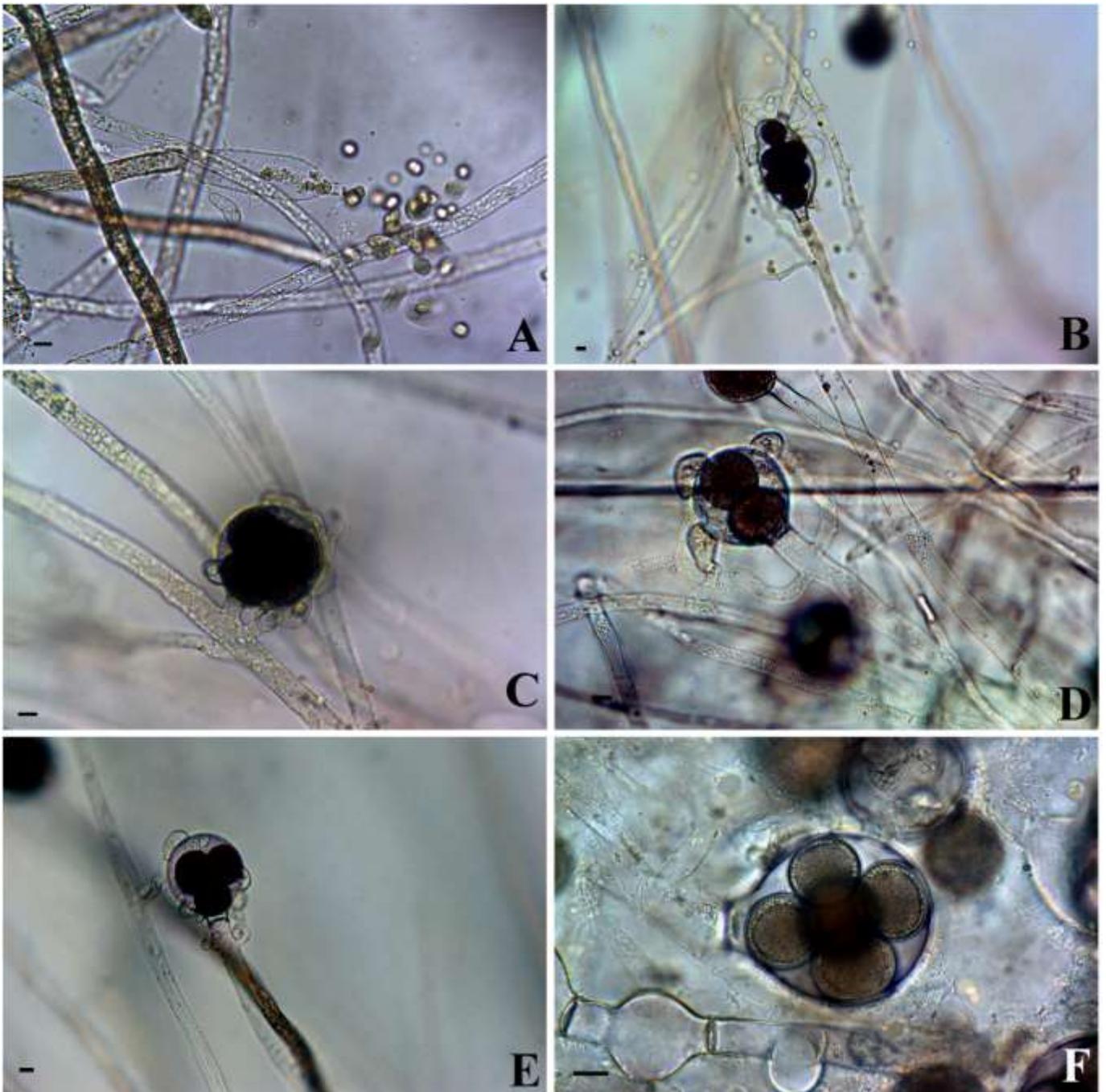


Figura 29 A-F. *Saprolegnia* sp. 2 – **A.** Liberação dos zoósporos saprolegnióide; **B.** Oogônio intercalar com anterídios; **C.** Oogônio lateral com anterídio monóclino e pedúnculo curto; **D.** Oogônio com anterídios ramificados; **E.** Oogônio com anterídios andróginos e díclinos; **F.** Oósporos subcêntricos. Barra = 10 μ m

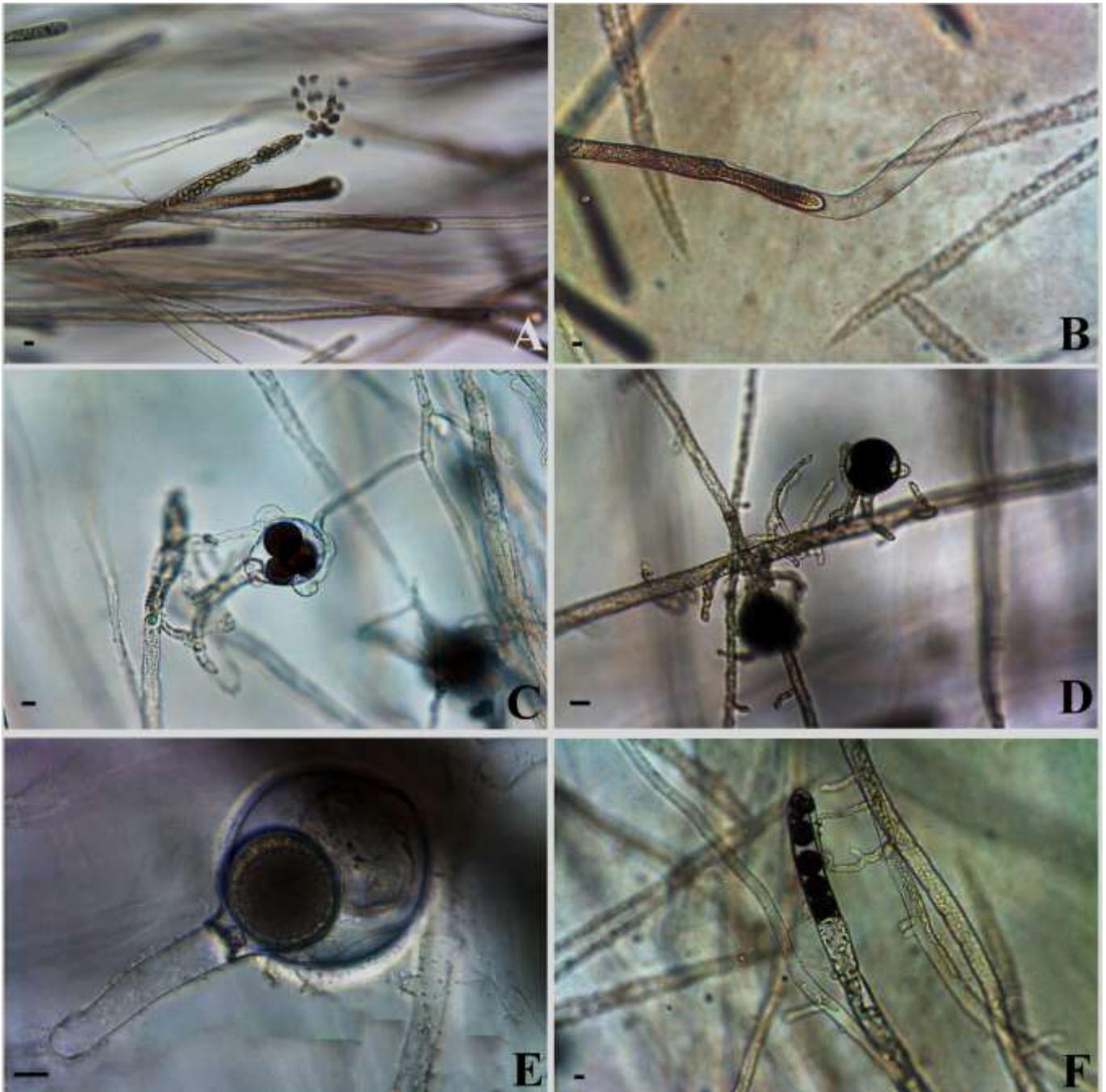


Figura 30 A-F. *Saprolegnia* sp. 4 – **A.** Liberação dos zoósporos saprolegnióide; **B.** Renovação do zoosporângio por proliferação interna; **C.** Oogônio em formação com anterídios díclinos e monóclinos; **D.** Visão da colônia com crescimento irregular de hifas; **E.** Oósporo subcêntrico em colônia velha; **F.** Oogônio formado dentro do zoosporângio vazio. Barra = 10 μ m

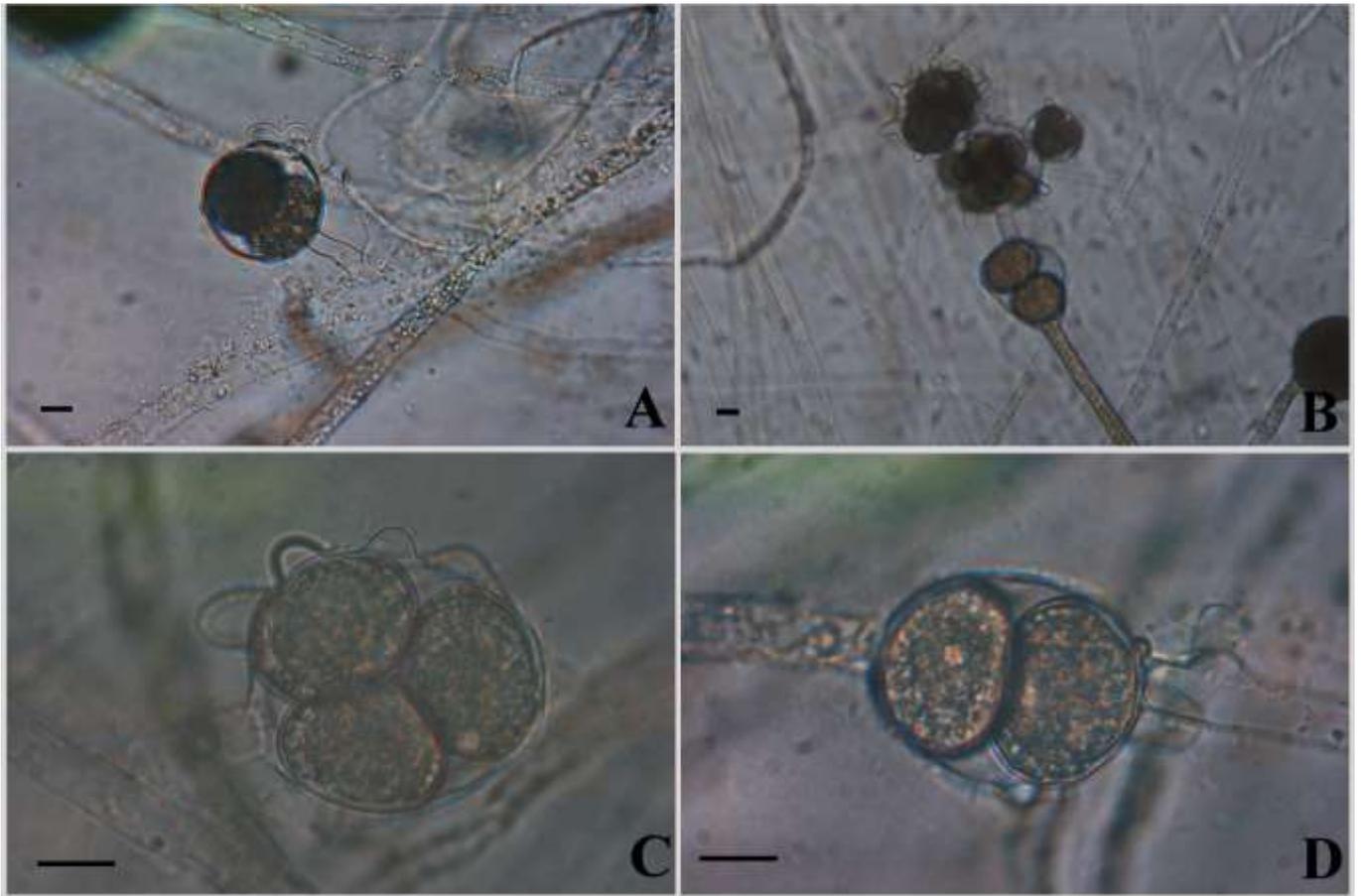


Figura 31 A-D. *Saprolegnia* sp. 5 – **A.** Oogônio com oosferas e anterídio; **B.** Oogônios ornamentados; **C.** Oogônio ornamentado com oósporo subcêntrico; **D.** Oogônio intercalar com oósporo subcêntrico. Barra = 10 μ m

4.3. Estudo filogenético dos espécimes

Foram realizadas análises da região LSU do rDNA para apresentação dos agrupamentos, tais como da ordem Saprolegniales e suas famílias Achlyaceae, Saprolegniaceae e Verrucalvaceae. A região ITS, considerada mais apropriada para estudos em nível de gênero/espécie devido ao seu caráter conservador (Leclerc et al. 2000, Robideau et al. 2011), foi utilizada para auxiliar na identificação dos espécimes em nível específico, por meio do programa BLASTn, como também para auxiliar no estudo em nível genérico. Constatou-se que a maioria dos gêneros da ordem Saprolegniales não conta ainda com um número significativo de sequências confiáveis para a realização de uma completa análise filogenética, a fim de se entender de forma abrangente o posicionamento das espécies dentro de cada gênero. Desta forma, apenas para o gênero *Saprolegnia* foi realizada análise filogenética com a região ITS, com enfoque no posicionamento da espécie nova para a ciência, das espécies identificadas e também para os espécimes identificados apenas em nível de gênero.

4.3.1. A ordem Saprolegniales

Foram selecionadas sequências da região LSU de algumas espécies obtidas neste estudo, e também disponíveis no GenBank (Anexo II), para a análise filogenética da ordem Saprolegniales, no intuito de evidenciar o posicionamento filogenético dos gêneros e dos agrupamentos destes dentro das famílias atualmente aceitas, utilizando-se espécies de *Pythium* como *outgroup* (Figura 32). A análise filogenética da região LSU com representantes de Saprolegniales corrobora a recente publicação de Beakes et al. (2014), onde *Leptolegnia* volta a fazer parte da família Saprolegniaceae e *Plectospira* e *Aphanomyces* são transferidos para a família Verrucalvaceae, com a concomitante exclusão da família Leptolegniaceae *sensu* Dick. As mudanças propostas por Beakes et

al. (2014) ocorreram após a inicialização deste estudo, no entanto, estes resultados dão suporte para estas transferências, tendo sido importante a inclusão de espécimes brasileiros pela primeira vez em análise filogenética da ordem. Dos gêneros considerados por Beakes et al. (2014) dentro de Saprolegniales, foram aqui estudados morfológicamente e molecularmente representantes de 60% deles, com a análise filogenética obtida evidenciando a segregação da ordem em três agrupamentos, que correspondem às famílias Achlyaceae, Saprolegniaceae e Verrucalvaceae.

Com suporte de 93%, a análise da ordem Saprolegniales apresenta a família Saprolegniaceae, a maior dentre as famílias, representada pelos gêneros *Aplanopsis*, *Calyptralegnia*, *Geolegnia*, *Leptolegnia*, *Protoachlya*, *Pythiopsis* e *Saprolegnia*, e por algumas espécies consideradas dentro dos gêneros *Achlya* e *Newbya* (Figura 32). Dos gêneros considerados por Beakes et al. (2014), somente *Isochlya* não foi inserido nas análises pela ausência de sequências disponíveis no GenBank. Este gênero não é aceito por alguns estudiosos do grupo, tais como Dick (1973) e Johnson et al. (2002), por ser considerado um gênero com características morfológicas muito próximas ao gênero *Saprolegnia*, o que é aceito no presente estudo. Dentro da família Saprolegniaceae, as espécies do gênero *Saprolegnia* formam um clado bem definido e com alto suporte (96%), ocorrendo o mesmo para o suporte de representantes do gênero *Protoachlya* (suporte de 100%) embora este se mostre pouco definido na análise. *Aplanopsis* e *Pythiopsis*, com uma espécie cada, se aproximam do gênero *Saprolegnia*, resultados também obtidos por meio das regiões LSU e ITS por Leclerc et al. (2000) e Steciow et al. (2013), e pela COX2 por Hudspeth et al. (2000). As espécies consideradas dentro do gênero *Achlya* agrupadas em Saprolegniaceae apresentam como característica comum a presença de oósporos subcêntricos e/ou cêntricos, não havendo nenhuma espécie do gênero com oósporo excêntrico presente nesta família. Este resultado está de acordo

com Spencer et al. (2002), os quais criaram o gênero *Newbya* para algumas destas espécies, levando em consideração a região SSU. Cinco representantes do gênero *Newbya* com sequências da região LSU do rDNA estão presentes nesta análise (AF119589, AF218173, AF119580, AF218175 e KP098361) (Figura 32). Resultado interessante obtido nesta análise filogenética refere-se ao gênero *Leptolegnia*, que já foi considerado dentro da família Leptolegniaceae *sensu* Dick e recentemente foi aceita por Beakes et al. (2014) em Saprolegniaceae, o qual evidenciou que este gênero não é monofilético, sendo o único na família Saprolegniaceae que possui espécies com oósporos excêntricos.

O segundo agrupamento, com suporte de 96%, corresponde a família Achlyaceae (Figura 32), recentemente criada por Beakes et al. (2014), a qual agrupa gêneros que possuem representantes exclusivamente com oósporos excêntricos, como *Achlya* (*sensu stricto*), *Brevilegnia*, *Dictyuchus* e *Thraustotheca*. Esta análise aponta que o agrupamento de espécies do gênero *Achlya* desta família é parafilético, bem como que o gênero *Thraustotheca* apresenta-se muito relacionado com as espécies de *Achlya* deste agrupamento, como anteriormente apontado em Riethmüller et al. (1999).

Com suporte de 73%, o terceiro agrupamento, corresponde à família Verrucalvaceae. Este é formado por dois gêneros antes considerados na família Leptolegniaceae: *Aphanomyces* e *Plectospira* (Figura 32). Além destes gêneros, *Pachymetra* e *Phragmosporangium* compõem este agrupamento, sendo que este último gênero foi originalmente inserido em Saprolegniaceae por meio de seus caracteres morfológicos descritos por Johnson et al. (2005a), sendo ignorado na publicação de Beakes et al. (2014), embora válido. Para este agrupamento, Beakes et al. (2014) consideraram ainda o gênero *Verrucalvus* (sem sequência disponível no GenBank), e supõem também que os gêneros *Sommerstorffia* e *Aquastella* possam fazer parte deste

agrupamento, pelo tipo de liberação dos zoósporos que apresentam, no entanto, não há sequências da região LSU disponíveis para estes gêneros.

A seguir serão apresentadas as famílias com os demais representantes sequenciados neste estudo, sendo discutido o posicionamento dos gêneros presentes nas análises. Uma discussão mais abrangente será realizada para o gênero *Saprolegnia*, o gênero melhor representado neste estudo.

4.3.1.1. A família Saprolegniaceae

Para estudo filogenético da família Saprolegniaceae foram selecionadas sequências para a região LSU de representantes das espécies obtidas neste estudo, bem como sequências selecionadas do GenBank (Anexo II), utilizando-se *Aphanomyces* como *outgroup* (Figura 33).

Os resultados filogenéticos de máxima verossimilhança para a região LSU mostram agrupamentos com baixos suportes presentes na família Saprolegniaceae. Este resultado é devido principalmente a falta de sequências, especialmente confiáveis, disponíveis para o grupo. Há um agrupamento melhor suportado dentro de toda a família (suporte de 67%), que inclui representantes dos gêneros *Calyptralegnia*, *Geolegnia*, espécies de *Leptolegnia* (*Leptolegnia caudata* de Bary – espécie tipo do gênero e *L. chapmanii* R.L. Szym.), espécies de *Achlya* (todas com oósporos cêntricos e/ ou subcêntricos) e *Newbya*. Todos os representantes de *Newbya* disponíveis para a região LSU estão presentes nesta análise, com os resultados demonstrando a complexidade nos estudos taxonômicos de espécies consideradas para este gênero.

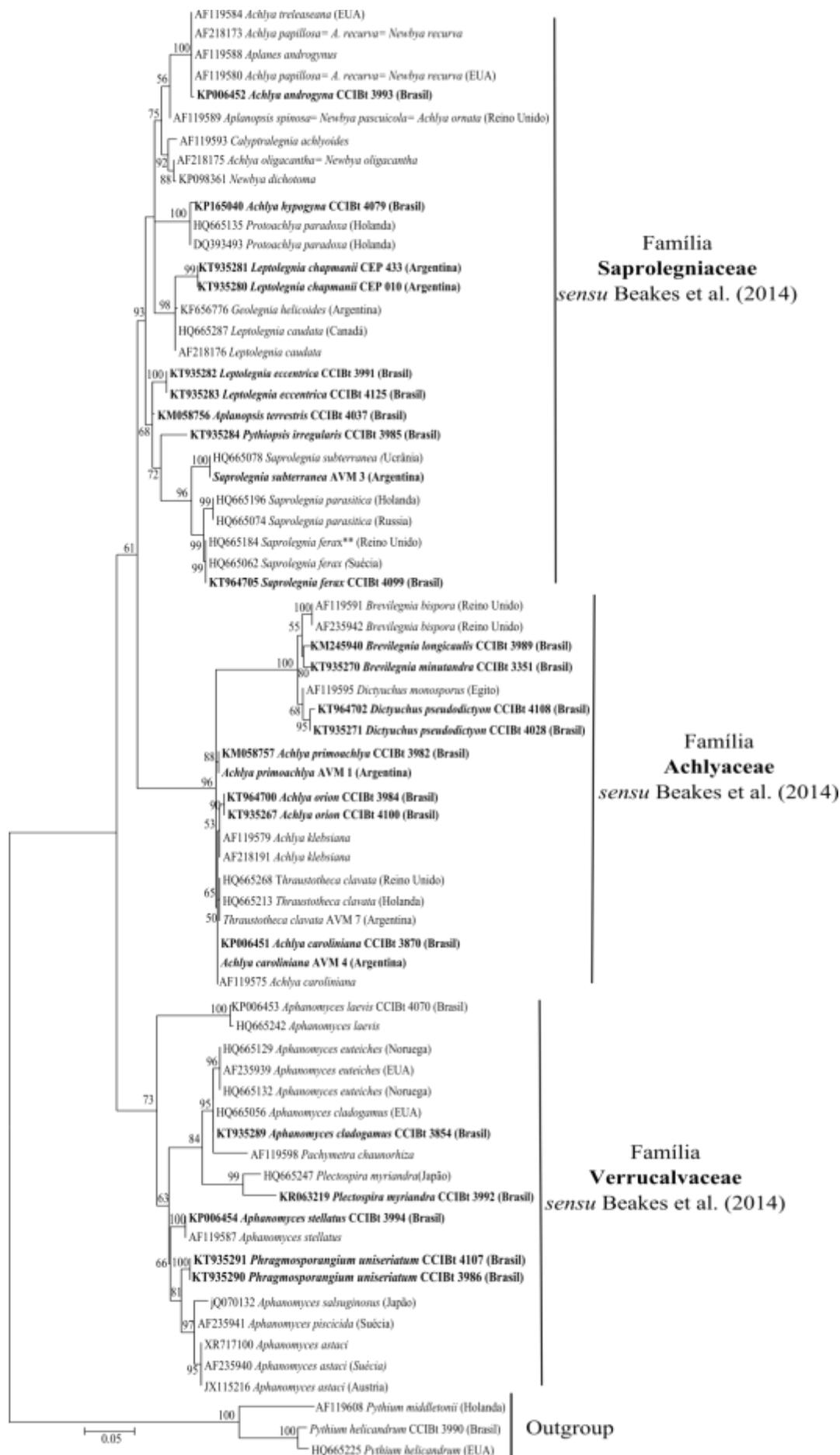


Figura 32. Árvore de Máxima Verossimilhança da região LSU do rDNA para Saprolegniales. Em negrito as sequências dos espécimes estudados**: indica as sequências identificadas de acordo com Sandoval-Sierra et al. (2014). Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap > 50 (%) para 1000 pseudo-réplicas e a barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. EUA: Estados Unidos da América. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; CEP: Coleção de culturas do Centro de Estudos Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano

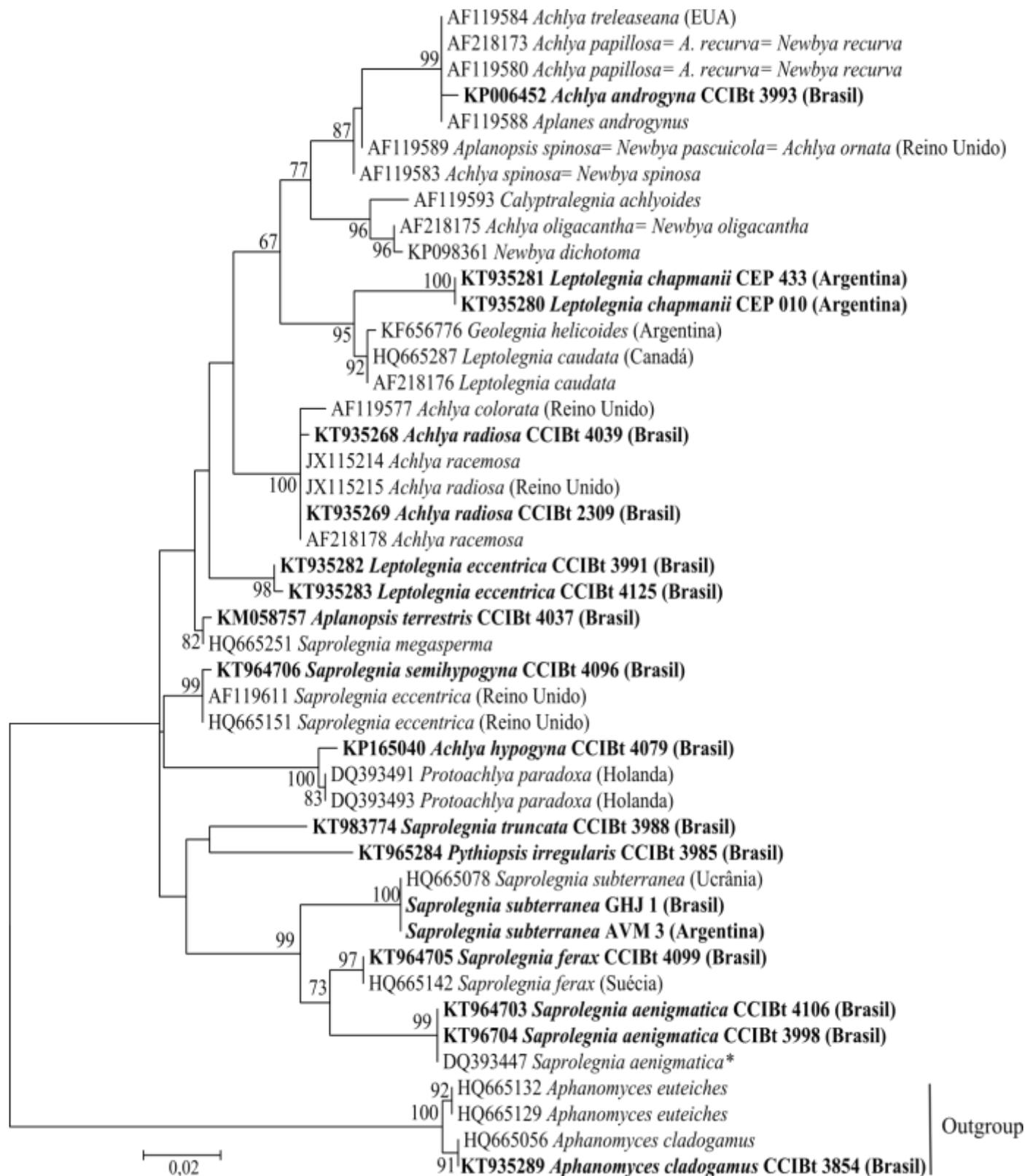


Figura 33. Árvore de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA de Saprolegniaceae. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. *: indica sequência identificada de acordo com Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015). Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas e na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. EUA: Estados Unidos da América. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; CEP: Coleção de culturas do Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores” CEPAVE-UNLP, Argentina. AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano. GHJ: Espécime de Gustavo Henrique Jerônimo

Para os gêneros *Aplanes* e *Calyptralegnia*, um único representante de cada gênero está disponível para esta região e foi utilizado nesta análise. Os resultados apontam que *Calyptralegnia*, gênero conhecido por possuir zoosporângios operculados, é próximo de espécies do gênero *Newbya* (zoosporângios não operculados), porém, sem estudar a morfologia do gênero/espécie, não se pode inferir sobre a motivação de proximidade apenas com base em dados moleculares. A espécie identificada neste estudo como *Achlya androgyna* CCIBt 3993 (KP006452) por meio da monografia de Johnson et al. (2002), foi inicialmente considerada dentro do gênero *Aplanes* por Coker (1923) devido à raridade na produção de zoosporângios. Estudos moleculares da região SSU realizados por Spencer et al. (2002) já haviam apontado que *Aplanes androgynus* (Coker 1923) e *Achlya treleaseana* (Coker & Matthews 1937, Johnson 1956) correspondem ao mesmo táxon, no entanto, os autores preferiram aguardar outros estudos para a efetiva sinonimização das espécies. Johnson et al. (2005b), baseando-se em morfologia, colocaram *Aplanes androgynus* (W. Archer) Humphrey e *Achlya treleaseana* (Humphrey) Kauffman como sinonímias de *Achlya androgyna* (W. Archer) T.W. Johnson & R.L. Seym. Os resultados moleculares da região LSU confirmam este posicionamento (Figuras 32 e 33). Apesar da transferência desta espécie para o gênero *Achlya* (Johnson et al. 2005b), as análises filogenéticas apresentadas demonstram que esta espécie deve ser transferida para o gênero *Newbya*.

Juntamente com as sequências de *Achlya androgyna* estão as sequências da espécie *A. papillosa* Humphrey depositadas no GenBank, a qual Spencer et al. (2002) consideraram como sinonímia de *Achlya recurva* Cornu, e a transferiu para o gênero *Newbya* - *Newbya recurva* (Cornu) M.W. Dick & M.A. Spencer. A sinonimização destas espécies não está presente nos principais bancos de dados internacionais. De acordo com Johnson et al. (2002) e Spencer et al. (2002), a descrição original da espécie

Achlya recurva Cornu foi realizada de forma simples e sem ilustrações. Este fato fez com que muitos erros de interpretações da espécie fossem se propagando ao longo dos anos. Ocorre que nos dias atuais dois distintos isolados são considerados para um mesmo nome taxonômico (Spencer et al. 2002). Na interpretação de Johnson et al. (2002), *Achlya recurva* Cornu apresenta oogônios com ornamentações truncadas e com oósporos excêntricos. Spencer et al. (2002) demonstraram a existência de dois diferentes isolados com o mesmo nome, no entanto, consideraram *Achlya recurva* Cornu, da descrição original, com oogônios papilados e com oósporos subcêntricos e/ou cêntricos, características próximas de *Newbya*. Enquanto o material analisado por Johnson et al. (2002), o qual apresenta oósporos excêntricos, é uma segunda espécie que foi vista inicialmente por Lathan (1935). Desta forma foi proposta a mudança nomenclatural desta última para *Achlya truncatiformis* M.W. Dick & M.A. Spencer seguindo assim a lei de prioridade de acordo com o Código de Nomenclatura Botânica.

Ainda de acordo com Spencer et al. (2002), *Achlya recurva* Cornu (descrição original) é sinônimo de *Achlya papillosa* Humphrey, apresentando características tais como ornamentações papiladas e raramente tuberculadas, com oósporos cêntricos, o que aproxima com a definição do gênero *Newbya*, sendo desta forma transferidas para este gênero como *Newbya recurva* (Cornu) M.W. Dick & M.A. Spencer. Se for considerada esta sinonimização (já que não há sequências de *Achlya recurva* (*Newbya recurva*) para a região LSU), e apesar da problemática apresentada para a grande proximidade das sequências identificadas por *A. papillosa* (AF218173 e AF119580) com a sequência da espécie que aqui foi identificada como *Achlya androgyna*, este resultado atesta a transferência de *A. androgyna* para o gênero *Newbya*, além das características morfológicas anteriormente citadas. No entanto, se faz necessário maiores estudos com o intuito de entender a relação entre estas espécies.

Também no mesmo agrupamento estão os representantes de *Leptolegnia chapmanii* CEP 433 (KT935281) e *L. chapmanii* CEP 010 (KT935280), importante oomiceto utilizado no controle biológico de insetos (Steciow et al. 2013, Páramo et al. 2015), próximas aos representantes de *Leptolegnia caudata* (HQ665287), *L. caudata* (AF218176) e *Geolegnia helicoides* (KF656776), agrupamento este com suporte de 95% (Figura 33). O gênero *Geolegnia* possui um único representante para a região LSU do rDNA, inserido nesta análise, e não foi estudado no presente trabalho, pois a coleção de culturas CCIBt não possui representantes do mesmo. Este gênero caracteriza-se pela ausência da produção de esporos flagelados (Harvey 1925), característica não usual para representantes da ordem Saprolegniales, no entanto, outras características morfológicas como hifas delgadas e oogônios com formação de um único oósporo excêntrico, a aproxima de *Leptolegnia*, acreditando-se que possa ter havido, dentro do processo evolutivo, a perda dos flagelos (Steciow et al. 2013). Um resultado bastante interessante ocorreu para os representantes de *Leptolegnia eccentrica* CCIBt 3991 (KT935282) e *L. eccentrica* CCIBt 4125 (KT935282). Esta espécie, que é aqui sequenciada pela primeira vez, surpreendentemente formou um ramo independente, com suporte abaixo de 50% dentro da família (Figuras 32 e 33), e não se agrupou com as demais espécies do gênero (*Leptolegnia caudata* de Bary e *L. chapmanii* R.L. Szym.), embora apresente o mesmo tipo de liberação dos zoósporos, uma das características utilizadas no passado para distinguir os gêneros. Johnson et al. (2002) comenta da similaridade desta espécie, no que se refere às características dos oósporos, com as estruturas de resistências formadas em espécies de *Leptolegniella*, gênero pertencente a Leptomitales dentro do filo Oomycota (Beakes et al. 2014). No entanto, ainda não se tem disponíveis sequências da região LSU de representantes deste gênero, de forma que não é possível inferir nesta possível relação e também infelizmente nenhuma cultura de *Leptolegnia eccentrica* está

disponível nas principais coleções mundiais. Estes resultados corroboram com Beakes et al. (2014) no que se refere ao posicionamento do gênero em Saprolegniaceae, mas indicam que o mesmo não é monofilético. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para subsidiar futuras decisões com relação a esta espécie.

Ainda no mesmo agrupamento, com suporte abaixo de 50% dentro da família, porém com alto suporte no agrupamento (100%), estão os representantes de *Achlya radiosa* Maurizio, *A. racemosa* Heldebr e *A. colorata* Pringsh, o que corrobora estudos anteriormente realizados por Riethmüller et al. (1999) e Leclerc et al. (2000). Embora estas espécies possuam liberação dos zoósporos do tipo aclióide e oósporos subcêntricos e/ou cêntricos, características comuns a *Newbya*, se mostram separadas de todas as demais espécies utilizadas na análise filogenética para a família. No presente estudo, apenas espécimes de *Achlya radiosa* (CCIBt 2309 e CCIBt 4039) foram minuciosamente trabalhadas em termos morfológicos. A partir destes resultados tem-se como hipótese que, após a realização de estudos moleculares de regiões gênicas adicionais, em consonância com estudos morfológicos de *Achlya colorata* e *A. racemosa*, estas espécies possam ser transferidas para um novo gênero.

De forma semelhante, o gênero *Aplanopsis*, com apenas um representante, apresenta-se sem suporte na análise, porém bem suportado próximo da sequência identificada como *Saprolegnia megasperma* Coker (HQ665251). Apesar de estar no GenBank, *Aplanopsis terrestris* foi sequenciado pela primeira vez para a região LSU neste estudo. Recente análise para a região ITS com espécies do gênero *Saprolegnia* depositados no GenBank, contestam a identificação da sequência de *Aplanopsis terrestris* (AB219375) (Sandoval-Sierra et al. 2014). Estes autores afirmam ser uma sequência de *Saprolegnia megasperma*, espécie esta com características distantes do espécime estudado. Por meio deste estudo, foi possível demonstrar que para a região

LSU também ocorre uma proximidade interessante entre ambas as espécies. Como não se tem acesso ao espécime de *Saprolegnia megasperma*, no momento, apenas se pode afirmar que os resultados morfológicos e moleculares aqui obtidos apontam para a identificação correta do espécime, o qual não apresentou formação de zoosporângios e posterior liberação dos zoósporos, com oogônios laterais, com esparsas ornamentações, formação de um único oósporo do tipo subcêntrico ou cêntrico, anterídios andróginos e monóclinos com atracção apical e lateral.

Apresentando-se como um terceiro agrupamento na análise da família Saprolegniaceae estão os representantes do gênero *Protoachlya* (figura 33) e algumas espécies de *Saprolegnia*. Este agrupamento é composto de representantes de *Saprolegnia eccentrica* (HQ665151), *S. eccentrica* (AF119611) e *S. semihypogyna* CCIBt 4096 (KT964706) (para mais detalhes ver seção 4.3.1.1.1), juntamente com representantes de *Protoachlya paradoxa* (DQ393491) e *P. paradoxa* (DQ393493), e também o representante de *Achlya hypogyna* CCIBt 4079 (KP165049). O gênero *Protoachlya* foi proposto por Coker (1923) que o considerou como um intermediário entre os gêneros *Achlya* e *Saprolegnia*. Apesar da liberação dos zoósporos primários ser aclióide, Johnson et al. (2002) consideraram o padrão de comportamento dos zoósporos como característica suficiente para mantê-lo separado de *Achlya*. Em *Protoachlya*, os zoósporos primários são providos de flagelos no momento da liberação, o mesmo não ocorrendo com representantes do gênero *Achlya*, no qual os flagelos são evanescentes. Steciow et al. (2014) definiram que espécies do gênero *Protoachlya* apresentam zoósporos dimórficos (primário + secundário), o mesmo apresentado pelas espécies de *Saprolegnia*. Estes autores também apresentaram análises filogenéticas para as regiões ITS, LSU e SSU do rDNA, para as quais as espécies de *Protoachlya* apresentam-se como um agrupamento bem definido dentro da ordem. Apesar do baixo suporte dentro

da família, estes resultados apontam que *Protoachya* pertence a família Saprolegniaceae, formando um agrupamento bem definido e comprovam que o espécime estudado de *Achlya hypogyna* (CCIBt 4079) está dentro do gênero *Protoachlya* (Figuras 32 e 33).

Outro agrupamento obtido neste estudo em Saprolegniaceae é composto por representantes dos gêneros *Pythiopsis* e *Saprolegnia* (Figura 33). Estudos anteriores indicaram uma relação próxima entre estes gêneros (Leclerc et al. 2000, Spencer et al. 2002). Apenas o representante *Pythiopsis irregularis* CCIBt 3985 (KT935284), espécie sequenciada e utilizada em uma análise filogenética pela primeira vez, é inserido nas análises, tendo em vista os estudos morfológicos e registros fotográficos que comprovam ser um representante do gênero. Nenhuma das sequências disponíveis de *Pythiopsis* depositadas no GenBank foi utilizada no presente estudo devido a problemas de identificação apontados em outros trabalhos publicados, tais como Steciow et al. (2014) e Sandoval-Sierra et al. (2014). Dentro deste agrupamento verifica-se uma proximidade interessante entre o espécime de *Saprolegnia truncata* CCIBt 3988 (KT983774) e *Pythiopsis irregularis* CCIBt 3985 (KT935284) (Figura 33), sendo ambos os únicos dentro do agrupamento que apresentam ornamentações claras e bem definidas na parede do oogônio. Este resultado aponta para uma relação importante a ser considerada em futuros estudos. Este estudo sugere a necessidade de uma criteriosa revisão do gênero *Pythiopsis*.

4.3.1.1.1. O gênero *Saprolegnia*

Dentro da família Saprolegniaceae, o gênero *Saprolegnia* foi o melhor representado no presente estudo, com a obtenção de sete espécimes identificados em nível específico. Na figura 34 é apresentada a árvore de máxima verossimilhança para a

região ITS do rDNA para o gênero. Somente espécies revisadas por Sandoval-Sierra et al. (2014) foram utilizadas nesta árvore (Anexo II). Estes autores fizeram uma extensa revisão das espécies de *Saprolegnia*, com sequências depositadas no GenBank, tendo desenvolvido para isto um sistema de identificação molecular baseado em unidades taxonômicas operacionais da região ITS (MOTUs: *molecular operational taxonomic units*), havendo modificações de identificação de muitas das espécies. Desta forma, a análise filogenética aqui apresentada não contempla todas as espécies sequenciadas e publicadas no GenBank para este gênero (Anexo II).

A análise filogenética da região ITS do rDNA evidenciou que o gênero *Saprolegnia* é polifilético, resultado já obtido por Molina et al. (1995) e Hulvey et al. (2007). Por meio desta análise foi corroborada a identificação morfológica de muitos espécimes aqui estudados (figura 34). Entre as espécies identificadas, têm-se duas que foram recentemente descritas. Uma delas é *Saprolegnia aenigmatica* Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo, recentemente publicada por Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015), permitindo assim a correção na identificação de diversas sequências presentes no GenBank que estavam com a identificação errônea ou sem identificação em nível específico. Os representantes de *Saprolegnia aenigmatica* CCIBt 4106 (KT964703) e *S. aenigmatica* CCIBt 3998 (KT974704) formaram um clado, não tão homogêneo, com outras da mesma espécie, porém com alto suporte (97%). Outra espécie estudada é *Saprolegnia semihypogyna* CCIBt 4096, recentemente descrita por Inaba & Tokumasu (2002), sendo a identificação obtida neste estudo de acordo com esta publicação. A análise para a região ITS evidencia sua proximidade com *Saprolegnia eccentrica* R.L. Szym., o mesmo pode ser verificado na análise de LSU para a família Saprolegniaceae (Figura 33). De acordo com a análise filogenética aqui apresentada, é evidenciado um agrupamento muito bem suportado com representantes de *Saprolegnia semihypogyna*

(AY647194) / *S. semihypogyna* (AB219395) e *S. eccentrica* (DQ393563) / *S. eccentrica* (KF18140) do GenBank. Com estes resultados moleculares e considerando os dados morfológicos discutidos anteriormente descritos por Seymour (1970), é sugerido aqui que *Saprolegnia semihypogyna* S. Inaba & Tokum e *S. eccentrica* R.L. Seym. sejam o mesmo táxon.

Por meio deste estudo também foi possível a identificação em nível específico de espécies que são consideradas bastante comuns no Brasil (Milanez et al. 2007), dentre elas está o representante de *Saprolegnia subterranea* GHJ 1, formando um clado bem suportado com o espécime da Argentina (*Saprolegnia subterranea* AVM 3) e outro do GenBank dos Estados Unidos da América, ficando desta forma separadas das demais espécies do gênero. Outra espécie comum no Brasil é *Saprolegnia ferax*, sendo esta a espécie tipo do gênero. Neste estudo foi possível notar que suas características morfológicas são bastante versáteis. Provavelmente, esta versatilidade da espécie foi o que induziu Johnson et al. (2002) a realizarem a sinonimização de diversas espécies que anteriormente foram publicadas como novas. Além dos estudos morfológicos, esta análise apresenta o representante de *Saprolegnia ferax* CCIBt 4099 (KT964705) com suporte de 100% juntamente com o representante do GenBank (KF717883), o que confirma a identificação.

Dentre as outras espécies de *Saprolegnia* estudadas, destaca-se *Saprolegnia truncata* R. L. Seym., espécie brasileira sequenciada pela primeira vez e aqui inserida numa análise filogenética. A espécie foi isolada de amostras de solo por R.L. Seymour do município de Manaus (AM) e sua descrição consta na publicação de Johnson et al. (2005a). Na análise aqui apresentada a espécie se mantém separada de todas as espécies do gênero (Figura 34), sendo este resultado já esperado devido as singulares características morfológicas desta espécie.

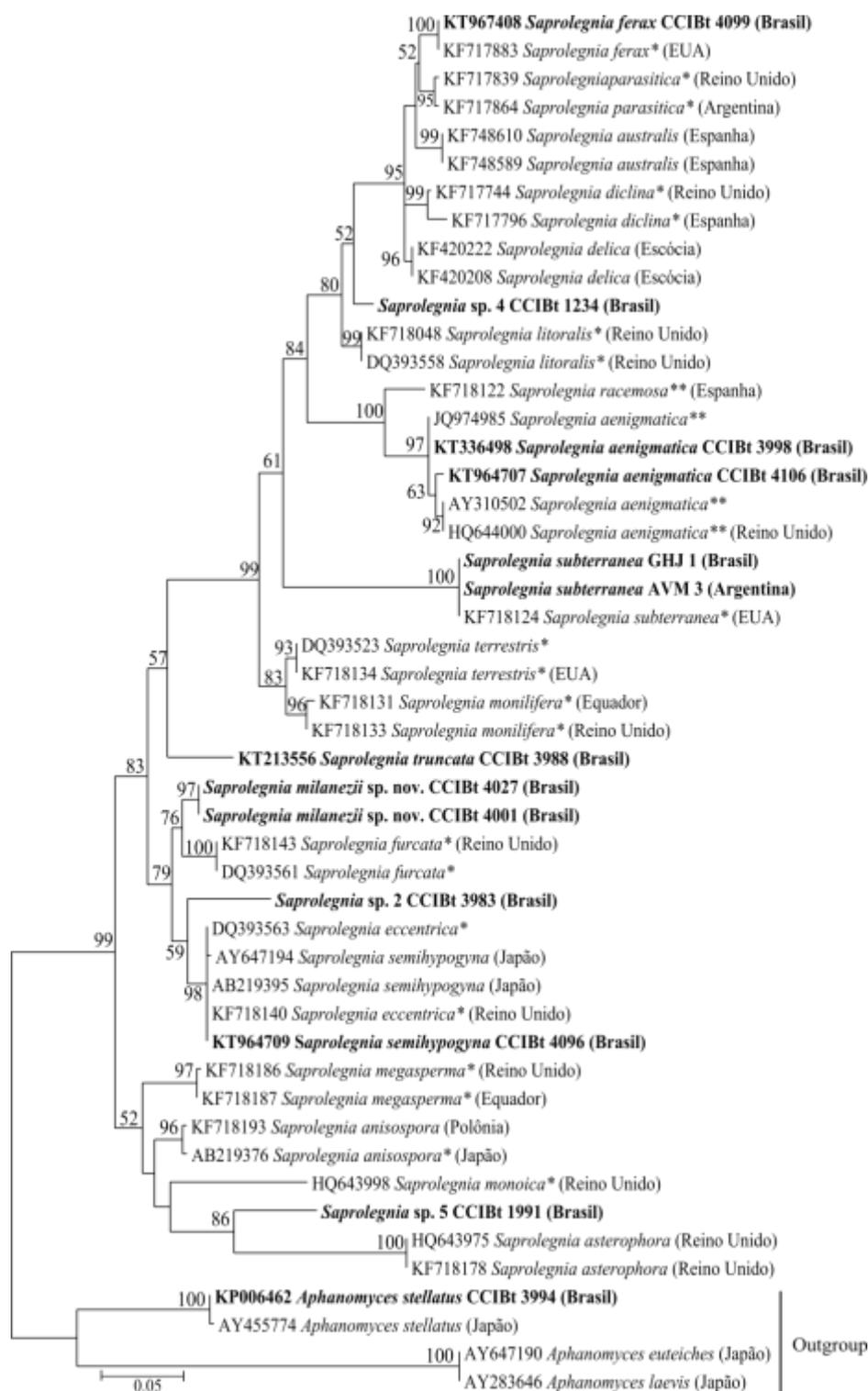


Figura 34. Árvore de Máxima Verossimilhança da região ITS do rDNA para o gênero *Saprolegnia*. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. *: indica sequências identificadas de acordo com Sandoval-Sierra et al. (2014). **: indica sequências identificadas de acordo com Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015). Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas e na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; EUA: Estados Unidos da América; AVM: espécimes de Agostina Virginia Marano; GHJ: espécime de Gustavo Henrique Jerônimo

Os resultados permitiram ainda apresentar uma nova espécie para a ciência, esta designada *Saprolegnia milanezii* sp nov., em homenagem ao pesquisador que iniciou no Instituto de Botânica (IBt) os estudos com fungos zoospóricos, Dr. Aduino Ivo Milanez. Esta espécie apresenta características morfológicas particulares. Além da identificação morfológica, a análise filogenética da região ITS do rDNA confirma ser este um novo táxon, apresentando-se num agrupamento com suporte de 76% juntamente com *Saprolegnia furcata* Maurizio (Figura 34). Porém, *Saprolegnia furcata* apresenta características morfológicas distintas da espécie nova, tais como pedúnculos oogoniais normalmente longos e pendentes, alguns enrolando, com formato espiral, oósporos centéricos e anterídios andróginos (Seymour 1970, Johnson et al. 2002). Apesar da proximidade morfológica de nossa espécie com a morfologia apresentada para as espécies *Saprolegnia megasperma* e *S. unispora*, a análise filogenética comprova a distância com *S. megasperma*, não havendo sequência de *S. unispora* disponível no GenBank, conforme revisão de Sandoval-Sierra et al. (2014).

Mesmo realizando estudos morfológicos e moleculares, algumas espécies não tiveram a identificação confirmada. Na análise filogenética apresentada para região ITS, o representante de *Saprolegnia* sp. 4 CCIBt 1234 apresenta-se sozinho separado das demais espécies do grupo e próximo ao agrupamento onde se encontra a espécie tipo do gênero, *Saprolegnia ferax*. Levando-se em consideração o protocolo recentemente proposto para a proposição de espécies novas em espécimes de *Saprolegnia* (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015) não é possível propor uma espécie nova, pois se tem apenas um espécime. Também, os dados morfológicos não foram conclusivos e desta forma decidiu-se por deixar esta espécie em nível de gênero. O mesmo ocorre para o espécime *Saprolegnia* sp. 2 CCIBt 3983. Este espécime foi inicialmente identificado por meio de dados morfológicos como pertencente a *Saprolegnia terrestris* Cookson.

Na análise da região ITS esta espécie ficou sozinha, apresentando-se como um grupo irmão de *Saprolegnia semihypogyna* e *S. eccentrica*. Muito embora tenha ficado separada das demais espécies do gênero, de acordo com o protocolo de Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015), não é possível propô-la como uma nova espécie para a ciência. Recentemente, a partir de uma nova coleta realizada no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), foi obtido um novo espécime que se assemelha a esta espécie, de forma que outros estudos serão realizados para complementar estes achados. Resultados interessantes foram obtidos para o espécime de *Saprolegnia* sp. 5 CCIBt 1991 sendo identificado morfológicamente como *Saprolegnia blelhamensis* por Gomes & Pires-Zottarelli (2006), com o depósito deste espécime na CCIBt. Após revitalização, o espécime apresentou características morfológicas diferentes da identificação apresentada Gomes & Pires-Zottarelli (2006), tais como a ausência de zoosporângios e presença de anterídios. O resultado filogenético mostra que esta espécie se aproxima de sequências de *Saprolegnia asterophora* de Bary disponíveis no banco de dados do GenBank, no entanto, a distância entre os ramos dos representantes destes espécimes, indica não ser o mesmo táxon. Por falta de sequências das demais espécies próximas, sendo estas *Saprolegnia blelhamensis* e *S. subeccentrica*, optou-se por não finalizar a identificação deste espécime em nível específico. Devido à versatilidade que apresentou este espécime no seu ciclo reprodutivo, têm-se dúvidas da existência real das três espécies. Apenas com os espécimes tipos sequenciados e análise morfológica detalhada será possível entender a relação entre estas espécies, no entanto, não há disponibilidade de *Saprolegnia subeccentrica* nem *S. blelhamensis* nas coleções mundiais mais conhecidas.

Os dados aqui apresentados para este gênero indicam fortemente que *Saprolegnia* precisa ainda de uma aprofundada revisão que envolva tanto os dados

moleculares quanto os morfológicos, pois se verifica que há ainda grandes problemas dentro do gênero.

4.3.1.2. A família Achlyaceae

Para a análise filogenética da família Achlyaceae foram inseridas sequências da região LSU de representantes de espécies de Achlyaceae obtidas neste estudo, bem como sequências selecionadas do GenBank (Anexo II), utilizando-se *Pythium* como *outgroup* (Figura 35). A análise filogenética de máxima verossimilhança apresenta dois agrupamentos bem definidos. No primeiro agrupamento estão presentes os representantes do gênero *Achlya* (espécies com oósporos excêntricos – *sensu stricto*) e *Thraustotheca*, apresentando um número expressivo de espécies de *Achlya* estudadas e com um evidente agrupamento parafilético. O gênero *Thraustotheca* difere do gênero *Achlya* pelo tipo de liberação dos zoósporos, este ocorre pela desintegração das paredes de formação dos zoosporângios (Johnson et al. 2002). Não foi possível o estudo de nenhum representante deste gênero por ausência de espécimes presente na coleção de culturas da CCIBt. Para o gênero *Achlya* não foi possível a inserção da espécie tipo do gênero, *Achlya prolifera* Nees, por falta de sequência para a região LSU, o que seria importante para inferir nos resultados encontrados. Provavelmente a espécie tipo estaria dentro da família Achlyaceae, por também possuir oósporos excêntricos.

Todas as espécies de *Achlya* estudadas tiveram sua identidade corroborada pelos estudos moleculares, com exceção de *Achlya oviparvula*. Um único representante foi obtido e estudado. Esta espécie é muito relacionada morfológicamente a *Achlya caroliniana*. Por este motivo é possível confundí-las, no entanto, *Achlya oviparvula* não produz anterídios em nenhuma fase do seu ciclo de vida, sendo então partenogenética. Estudos aqui realizados para espécimes pertencentes as duas espécies concluem que

realmente são espécies diferentes quando se é considerado as características morfológicas, anteriormente relatadas. De acordo com o resultado obtido na análise filogenética, não foi possível corroborar os dados morfológicos encontrados com os resultados moleculares da região LSU de forma efetiva, isto porque não há outro espécime sequenciado de *Achlya oviparvula* no GenBank, o que daria maior subsídio para as análises, além disso, há o fato das espécies excêntricas de *Achlya* apresentarem poucas divergências nucleotídicas para esta região, como já apontado por Riethmüller et al. (1999). Também pela primeira vez foi sequenciada a espécie *Achlya orion* com dois representantes (CCIBt 3984 e CCIBt 4100), os quais se apresentam bem definidos na análise apresentada. A espécie é muito comum no Brasil (Milanez et al. 2007), sendo desta forma uma importante contribuição. Outra espécie comum no Brasil, o representante de *Achlya flagellata* CCIBt 3980 (KR063221) posicionou-se próximo da sequência disponível no GenBank para a região LSU. O resultado BLASTn para a região ITS foi inconclusivo para esta espécie (Anexo I). *Achlya primoachlya*, espécie com oogônios com diferentes tipos de ornamentações, teve a região LSU primeiramente sequenciada neste estudo. Os resultados mostraram este representante (CCIBt 3982) juntamente com o da Argentina (AVM 1), sendo o resultado BLASTn da região ITS corroborado a identificação (Anexo I). De forma diferente ocorreu para o representante de *Achlya crenulata* CCIBt 3997 (KT964699), este formou um clado separado das espécies de *Achlya sensu stricto*, juntamente ao único representante de *A. crenulata* (AF218192) disponível no GenBank. O resultado BLASTn da região ITS também corroborou a identificação, apesar da baixa similaridade apresentada (Anexo I).

Apresentando-se como um agrupamento irmão do gênero *Achlya/Thraustoteca*, o segundo agrupamento é representado pelos gêneros *Dictyuchus* e *Brevilegnia*. Pela

primeira vez foi sequenciada a espécie *Dictyuchus pseudodictyon*, com o estudo de dois diferentes espécimes. Ambos os espécimes apresentaram reprodução sexuada apenas na amostra original, tornando-se estéreis após o cultivo *in vitro*. Johnson et al. (2002), consideram apenas duas espécies válidas para o gênero, *Dictyuchus monosporus* (espécie heterotática) e *D. pseudodictyon*, sendo ambos com representantes presentes na análise da região LSU. Devido à versatilidade do ciclo reprodutivo presente no espécime aqui estudado, considerando as muitas outras espécies válidas no banco de dados do mycobank (www.mycobank.org) é sugerido que maiores estudos sejam realizados para a constatação da existência destas espécies. Apresentando-se muito próximo ao gênero *Dictyuchus*, estão os representantes do gênero *Brevilegnia*. Neste estudo, *Brevilegnia longicaulis* foi sequenciada pela primeira vez. Esta espécie apresentou liberação dos zoósporos pelos zoosporângios primários do tipo aclióide, já relatada para várias outras espécies de *Brevilegnia* (Coker 1927). No entanto, os resultados para a região LSU mostraram que o espécime se aproxima das demais espécies de *Brevilegnia*, juntamente ao agrupamento de espécies do gênero *Dictyuchus* e *Brevilegnia minutandra* (CCIBt 3351). Esta última espécie citada possui sequência disponível no GenBank apenas para a região ITS, sendo a primeira vez que a espécie foi sequenciada para a região LSU do rDNA. O resultado BLASTn desta espécie não foi conclusivo para a região ITS (Anexo I). É possível concluir que estes dois gêneros são bastante próximos.

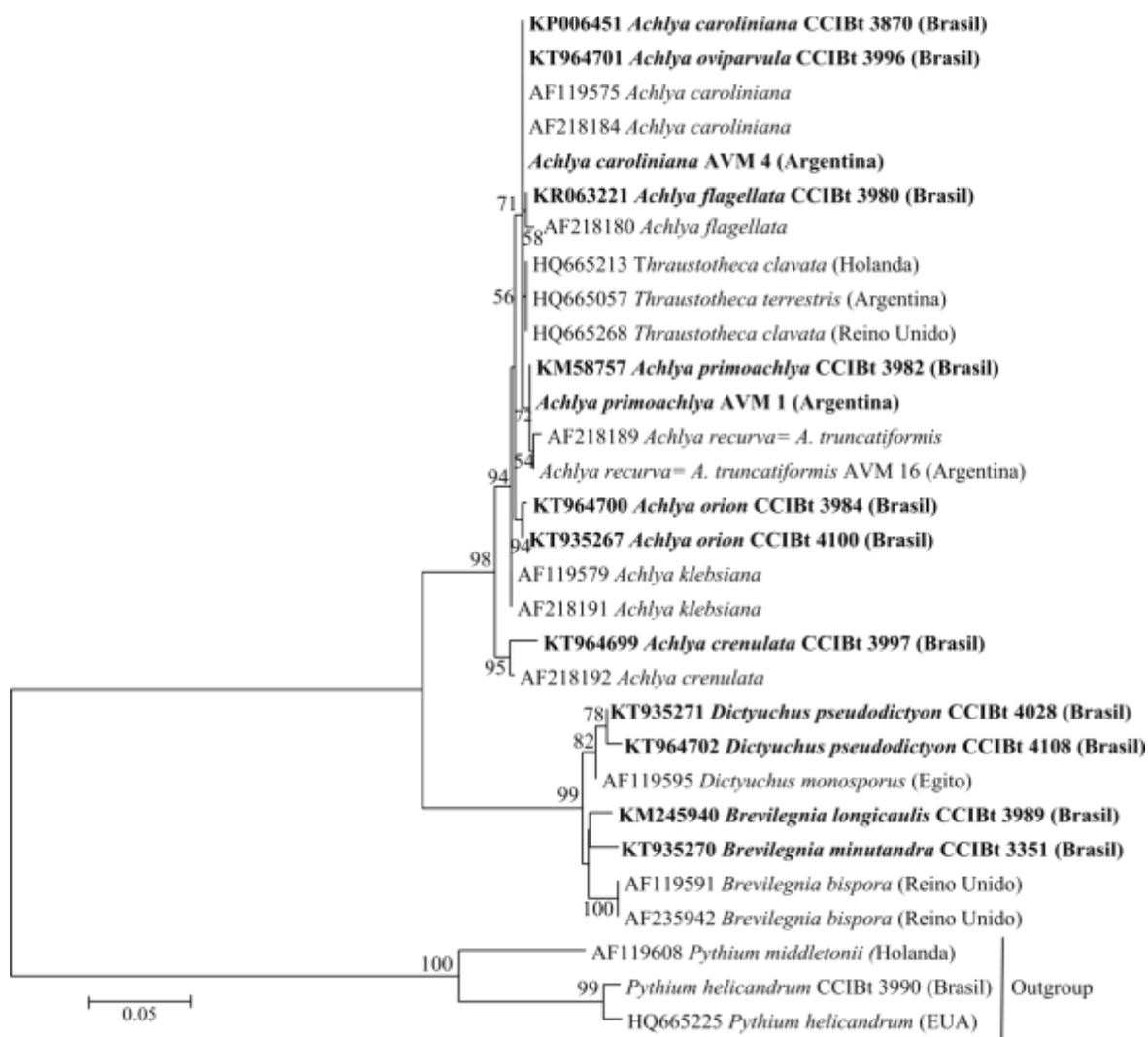


Figura 35. Árvore de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA para Achlyaceae. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas. Na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. EUA: Estados Unidos da América. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; AVM: Espécimes de Agostina Virginia Marano

4.3.1.3. A família Verrucalvaceae

Para a análise filogenética da família Verrucalvaceae foram inseridas sequências da região LSU de representantes de espécies obtidas neste estudo, bem como sequências selecionadas do GenBank (Anexo II), utilizando-se *Saprolegnia* como *outgroup* (Figura 36). Por meio da análise filogenética de máxima verossimilhança da região LSU,

constata-se que as espécies de *Aphanomyces* e *Plectospora* estão presentes em um agrupamento juntamente com *Pachymetra chaunorhyza* (AF119598). Este último gênero citado foi considerado dentro da família Verrucalvaceae por Dick et al. (1984), que anteriormente fazia parte da Ordem Sclerosporales do filo Oomycota. Conclui-se que todos estes gêneros fazem parte da mesma família, corroborando os resultados apresentados por Beakes et al. (2014).

É possível observar nessa análise que o gênero *Aphanomyces* forma diferentes agrupamentos. No GenBank há um número elevado de sequências de representantes do gênero *Aphanomyces* de diferentes regiões gênicas, por se tratar de um gênero bastante estudado devido, em parte, a sua atuação como parasita (Huang et al. 1994, Diéguez Uribeondo et al. 2009, Strand et al. 2012). Desta forma, foi possível a obtenção de diversas sequências das espécies deste gênero para utilização na análise filogenética de Verrucalvaceae, embora o número de espécies estudadas não tenha sido grande. Os resultados filogenéticos apontam para a formação de três agrupamentos bem suportados, o que corrobora os resultados encontrados por Diéguez-Urbeondo et al. (2009) com estudos para a região ITS, com a divisão em linhagens evolutivas pelo modo de nutrição e habitat. Entre as espécies de *Aphanomyces* estudadas está o tipo do gênero *Aphanomyces stellatus* (Figura 36). Esta espécie teve a identificação corroborada por meio de análise filogenética, na qual o representante que foi aqui sequenciado de *Aphanomyces stellatus* CCIBt 3994 (KP006454) está bem suportado com a sequência de outro espécime do GenBank (AF119587) e separado das demais espécies do gênero (Figura 36). Além disso, o resultado BLASTn para a região ITS também confirmou a identificação (Anexo I).

Apresentando-se dentro do agrupamento no qual se encontra a espécie tipo do gênero *Aphanomyces stellatus*, estão os representantes do gênero *Phragmosporangium*.

Este se apresenta definido e bem suportado dentro de Verrucalvaceae. O gênero foi isolado a partir de estudos com amostras de solo na África (Johnson et al. 2005a) sendo o gênero monoespecífico, com a espécie *Phragmosporangium uniseriatum*, a qual possui como tipo apenas sua ilustração. A espécie foi registrada no Brasil como segunda ocorrência mundial, mostrando-se muito comum em solo de áreas de Mata Atlântica, sapróbia em substrato queratinoso (Pires-Zottarelli et al. 2007). No presente estudo, pela primeira vez este gênero é sequenciado, sendo que para a região LSU foi obtido o sequenciamento de dois espécimes e confirmado o seu posicionamento. Apesar da singularidade presente na formação dos zoosporângios e pelo tipo de liberação dos zoósporos apresentado por este gênero, o mesmo tem características comuns ao gênero *Aphanomyces*, que inclui a formação de um único oósporo por oogônio, justificando sua presença em Verrucalvaceae.

Também presente em Verrucalvaceae, o gênero *Plectospira* apresenta-se próximo de algumas espécies do gênero *Aphanomyces*. De acordo com Johnson et al. (2002), duas espécies são válidas, *Plectospira gemmifera* (espécie que produz um número expressivo de gemas) e *P. myriandra*, estando esta última aqui representada (CCIBt 3992; KR063219) com um único representante para a região LSU. Conforme o resultado desta análise (Figura 36), há diferenças entre os ramos dos espécimes estudados e da sequência depositada no GenBank do Japão. Uma hipótese é que esta distância pode estar relacionada as localidades de origem dos espécimes, ou ainda, por diferenças presentes no tamanho das sequências. Para apenas um de dois espécimes estudados foi possível o sequenciamento da região LSU, mesmo após diversas tentativas. O resultado BLASTn para a região ITS dos dois espécimes que foram obtidos neste estudo (CCIBt 3992 e CCIBt 3372), confirmou a identificação, apesar da baixa similaridade (anexo I).

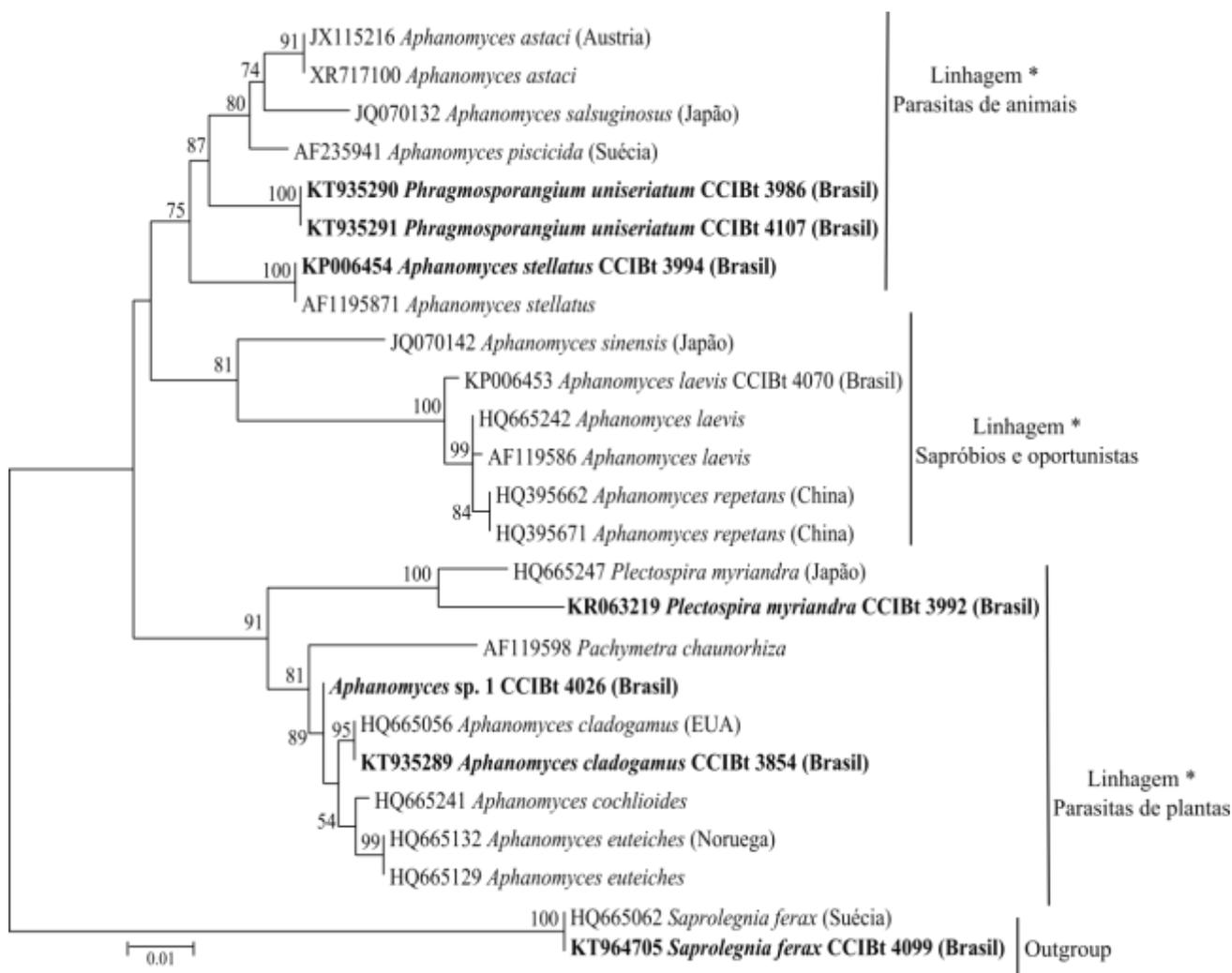


Figura 36. Árvore de máxima verossimilhança da região LSU do rDNA para Verrucalvaceae. Em negrito as sequências dos espécimes estudados. *: Divisão apontada por Diéguez- Uribeondo et al. (2009) para linhagens evolutivas com estudos para o gênero *Aphanomyces*. Valores próximos aos ramos indicam suporte de bootstrap >50 (%) para 1000 pseudo-réplicas. Na barra horizontal mostra o número de substituições por sítio. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica; EUA: Estados Unidos da América

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribui de forma significativa para a taxonomia da ordem Saprolegniales, com a junção de estudos morfológicos com registros fotográficos e análises moleculares, apresentando o sequenciamento de duas regiões gênicas com estudo de 31 diferentes espécies. Apesar da proposição das três famílias anteriormente relatada, os resultados apresentados são inéditos na demonstração da formação dos três agrupamentos presentes nesta ordem, com o uso de sequências obtidas no presente estudo e também disponíveis no GenBank. No entanto, os estudos com estas famílias demonstram que maiores pesquisas se fazem necessárias e devem ser realizadas no sentido de compreender a relação e o posicionamento dos gêneros, sobretudo para a família Saprolegniaceae, a qual possui maior quantidade de gêneros.

Pela primeira vez espécimes brasileiros foram sequenciados e inseridos em um trabalho filogenético. No entanto, a ausência de sequências confiáveis no GenBank e também, o pequeno número de espécies sequenciadas dificultou o aprofundamento das análises gerando a necessidade de inserção de outros espécimes. Das 26 espécies certificadas, oito são aqui sequenciadas pela primeira vez, todas com comprovação da identificação por meio de estudos morfológicos apresentados, o que possibilitou contribuir com o banco de dados gênico, por meio da inclusão de sequências confiáveis, em se tratando de sequências cujos estudos morfológicos foram minuciosamente realizados com os espécimes.

Como resultados específicos, os dados para a região LSU do rDNA mostraram que o gênero *Leptolegnia* pertence a Saprolegniaceae, porém este não é monofilético, com a separação de *Leptolegnia eccentrica* dos demais representantes do gênero. De acordo com as análises apresentadas, é necessário que esta espécie seja designada como um novo gênero, porém os baixos suportes apresentados nas análises impedem que esta

mudança ocorra no momento. Também, por meio deste estudo foi possível constatar que o gênero *Phragmosporangium*, sequenciado pela primeira vez, pertence a família Verrucalvaceae, e não mais em Saprolegniaceae. Ainda foi possível a descoberta de uma nova espécie para ciência, a qual foi designada *Saprolegnia milanezii* sp. nov., com a obtenção de dois espécimes, seguindo assim o protocolo recentemente proposto para o gênero.

Os resultados obtidos reforçam para a importância da parceria entre a morfologia e a ferramenta molecular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos CJ. Mims CW. Blackwell M.** 1996. *Introductory Mycology*. 4ed. John Wiley & Sons, New York.
- Aquiloni L. Martín MP. Gherardi F. Diéguez-Uribeondo J.** 2011. The North American crayfish *Procambarus clarkii* is the carrier of the oomycete *Aphanomyces astaci* in Italy. *Biological Invasions* 13: 359–367.
- Araujo JPM. Hughes DP.** 2014. Diversity of entomopathogens Fungi: Which groups conquered the insect body? *Biorxiv* IV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/003756>. Acesso em: 23 dez. 2015.
- Ault KK. Johnson JE. Pinkart HC. Wagner RS.** 2012. Genetic comparison of water molds from embryos of amphibians *Rana cascadae*, *Bufo boreas* and *Pseudacris regilla*. *Diseases of Aquatic Organism* 99: 127–37.
- Beakes GW. Honda D. Thines M.** 2014. Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *In: The Mycota VIII Part A*. McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 39–97.
- Beneke ES. Rogers AL.** 1962. Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Paraná, Brazil. *Rickia* 1: 181–193.
- van den Berg AH. Mclaggan D. Diéguez-Uribeondo J. van West P.** 2013. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews* 27: 33–42.
- Blaustein AR. Walls SC. Brancoft BA. Lawler JJ. Searle CL. Gervasi SS.** 2010. Direct and Indirect Effects of Climate Change on Amphibian Populations. *Diversity* 2: 281–313.

- Briard M. Dutertre M. Rouxel F. Brygoo Y.** 1995. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. *Mycological Research* 99: 1119–1127.
- Coker WC. Pemberton JD.** 1908. A new species of *Achlya*. *Botanical Gazette Crawfordsville* 45: 194–196.
- Coker WC.** 1923. The saprolegniaceae with notes on other water molds. University North Carolina Press, Chapel Hill.
- Coker WC. Couch JN.** 1924. Revision of the genus *Thraustotheca* with a description of a new species. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*. 40: 197–202.
- Coker WC.** 1927. Other water molds from the soil. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 42: 207–226.
- Coker WC. Matthews VD.** 1937. New species of *Achlya* and *Apodachlya*. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 54: 311–318.
- Daugherty J. Evans TM. Skillom T. Watson LE. Money NP.** 1998. Evolution of spore release mechanisms in the Saprolegniaceae (Oomycetes): evidence from a phylogenetic analysis of internal transcribed spacer sequences. *Fungal Genetics and Biology* 24: 354–363.
- Dick MW.** 1969. The *Scoliolegnia asterophora* aggregate, formerly *Saprolegnia asterophora* de Bary (Oomycetes). *Botanical Journal of the Linnean Society* 62 : 255–266.
- Dick MW.** 1973. Saprolegniales. *In: The fungi: an advanced treatise*. Ainsworth GC. Sparrow FK. Sussman AS. (eds.). Academic Press Inc. New York, pp.113–144.
- Dick MW. Wong PTW. Clark G.** 1984. The identity of the oomycete causing 'Kikuyu Yellows', with a reclassification of the downy mildews. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 89: 171–197.

- Dick MW. Vick MC. Gibbings JG. Hederson TA. Lopez-Lastra CC.** 1999. 18 S rDNA for species of *Leptolegnia* and other Peronosporomycetes: justification for the subclass taxa Saprolegniomycetidae and Peronosporomycetidae and division the Saprolegniaceae *sensu lato* into the families Leptolegniaceae and Saprolegniaceae. *Mycological Research* 103: 1119–1125.
- Diéguez-Uribeondo J. Huang TS. Cerenius L. Söderhäll K.** 1995. Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research* 99: 574–578.
- Diéguez-Uribeondo J. Fregeneda-Grandes JM. Cerenius L. Pérez-Iniesta E. Allergancedo JM. Tallería MT. Söderhäll K. Martín MP.** 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetic Biology* 44: 585–601.
- Diéguez-Uribeondo J. Garcia MA. Cerenius L. Kozúbiková E. Ballesteros I. Windels C. Weiland J. Kator H. Söderhäll K. Martín MP.** 2009. Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetic Biology* 46: 365–376.
- Dissman E.** 1931. Zur Kenntnis einer neuen *Isoachlya*- Art aus dem Erdboden. (Neue und wenig bekannte Phycomyceten aus Lunz a. See. I.). Beihefte zum Botanischen Zentralblatt 48: 103–111.
- Drechsler C.** 1927. Two water molds causing tomato rootlet injury. *Journal of Agricultural Research* 34: 287–296.
- Fernández-Benítez MJ. Ortiz-Santaliestra ME. Lizana M. Diéguez-Uribeondo J.** 2007. *Saprolegnia diclina*: another species responsible for the emergente disease

'*Saprolegnia* infections' in amphibians. Federation of European Microbiological Societies 279: 23–29.

Furtado JS. 1965. A new aquatic fungi, *Achlya benekei* sp. nov. Rickia 2: 121–127.

Garlindo-Leal C. Câmara IG. (Eds.) 2005. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Fundação SOS Mata Atlântica: São Paulo, 472 p.

Gaulin E. Jacquet C. Bottin A. Dumas B. 2007. Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. Molecular Plant Pathology 8: 539–548.

Gomes AL. Pires-Zottarelli CLA. 2006. Diversidade de Oomycota da Reserva Biológica de Paranapiacaba, Santo André, SP: primeiras citações para o Brasil. Revista Brasileira de Botânica 29: 569–577.

Gomes AL. Pires-Zottarelli CLA. 2008. Oomycota (Straminipila) da Reserva Biológica de Paranapiacaba, Santo André, SP, Brasil. Acta Botanica Brasilica 22: 373–392.

Gleason FH. Chambouvet A. Sullivan BK. Lilje O. Rowley JJJ. 2014. Multiple zoosporic parasites pose a significant threat to amphibian populations. Fungal Ecology 11: 181–192.

Gul HT. Saheed S. Khan FZA. 2014. Entomopathogenic Fungi as Effective Insect Pest Management Tactic: A Review. Applied Sciences and Business Economics 1: 10–18.

Gunderson JL. Elwood H. Ingold A. Kindle K. Sogin ML. 1987. Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes and oomycetes. Proceeding of the National Academy of Sciences 84: 5823–5827.

Harvey JV. 1925. A study of the water molds and *Pythiums* occurring in the soils of Chapel Hill. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society 41: 151–164.

- Höhnk W.** 1952. Nachtrag zu: Die in Nordwestdeutschland gefundenen ufer- und boden bewohnenden Saprolegniaceae. Veröffentlichungen des Institutes für Meeresforschung in Bremerhaven. 1: 126–128.
- Huang TS. Cerenius L. Söderhäll K.** 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. Aquaculture 126: 1–10.
- Hudspeth DSS. Nadler SA. Hudspeth MES.** 2000. A COX2 molecular phylogeny and phylogeny of the Peronosporomycetes. Mycologia 92: 674–684.
- Hulvey JP. Padgett DE. Bailey JC.** 2007. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. Mycologia 99: 421–429.
- Hussain QA. Pandit AK.** 2012. Global amphibian declines: A review. International Journal of Biodiversity and Conservation 10: 348–357.
- Inaba S. Tokumasu S.** 2002. *Saprolegnia semihypogyna* sp. nov., a saprolegniaceous oomycete isolated from soil in Japan. Mycoscience 43: 73–76.
- Jesus AL. Marano AV. Schoenlein-crusius IH. Pires-Zottarelli CLA.** 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Hoehnea 40: 167–180.
- Jesus AL. Marano AV. De Souza JI. James TY. Jerônimo GH. Rocha SCO. Gonçalves DR. Boro MC. Pires-Zottarelli CLA.** 2015. *Achlya catenulata* sp. nov. a new Saprolegniales (Oomycetes, Straminipilia) from Brazilian mangrove swamp. Phytotaxa 212: 221–228.
- Johnson Jr. TW.** 1950. A study of an isolate of *Brevilegnia* from New Caledonia. Mycologia 2: 242–252.

- Johnson Jr. TW.** 1956. The genus *Achlya*: morphology and taxonomy. University of Michigan Press, Michigan.
- Johnson Jr. TW. Seymour RL. Padgett DE.** 2002. Biology and systematic of the Saprolegniaceae(<http://dl.uncw.edu/digilib/biology/fungi/taxonomy%20and%20systematics/padgett%20book>).
- Johnson Jr. TW. Seymour RL. Padgett. DE.** 2005a. Systematics of the Saprolegniaceae: New taxa. Mycotaxon 92: 1–10.
- Johnson Jr. TW. Seymour RL. Padgett. DE.** 2005b. Systematics of the Saprolegniaceae: New combination. Mycotaxon 92: 11–32.
- Kazutaka K. Daron MS.** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772–780.
- Ke XL. Wang JG. Gu ZM. Li M. Gong XN.** 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (Oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish. Mycological Research 113: 637–644.
- Kirk PMC. Anon PF. Minter DW. Stalpers JA.** (Eds.) 2008. Dictionary of fungi. 10. ed. CAB International: Wallingford, 771p.
- Kiesecker JM.** 2010. Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. Environmental Change, Pathogens and Human Linkages 26: 897–908.
- Kiziewicz B. Diéguez-Uribeondo J. Martin MP.** 2013. Water *Saprolegnia diclina* (FLO) isolated from eggs of *Carassius carassius* L. in Bialystok Rivers, Poland. African Journal of Microbiology Research 7: 5406–5410.
- Kozubíková E. Filipova L. Kozak P. Duris Z. Martin M. Diéguez-Uribeondo J. Oidtman B. Petrussek A.** 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen

Aphanomyces astaci in invasive American crayfishes in the Czech Republic. Conservation Biology Journal 23: 1204–1213.

Lamour K. Finley L. 2006. A strategy for recovering high quality genomic DNA from a large number of *Phytophthora* isolates. Mycologia 98: 514–517.

Lathan DH. 1935. *Achlya recurva* Cornu from North Carolina. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society 51: 183–187.

Leclerc MC. Guillot J. Deville M. 2000. Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. Antonie Van Leeuwenhoek 77: 369–377.

Lyra NP. Milanez AI. 1974. Notas para o levantamento dos ficomicetos aquáticos do estado de São Paulo. Publicação do Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco 698: 1–27.

Maia LC. Carvalho Jr. AA. 2015. Fungos *in*: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128475>>. Acesso em: 10 Jan. 2016.

Maia LC. De Carvalho Jr. AA. Cavalcanti LH. Gugliotta AM. Drechsler-Santos ER. Santiago ALMA. Cáceres MES. Gibertoni TB. Aptroot A. Giachini AJ. Adriene M. da S. Soares AMS. Allyne C.G. Silva ACG. Altielys C. Magnago AC. Bruno T. Goto BT. Lira CRS. Montoya CAS. Pires-Zottarelli CLA. da Silva DKA. Soares DJ. Rezende DHC. Luz EDMN. Gumboski EL. Wartchow F. Karstedt F. Freire FM. Coutinho FP. de Melo GSN. Sotão HMP. Baseia IG. Pereira J. Jadson JS. de Oliveira JJS. Souza JF. Bezerra JL. Neta LSA. Pfenning LH. Gusmão LFP. Neves MA. Capelari M. Melissa MCW. Pulgarín MP. Junior NM. de Medeiros PS. Friedrich RCS. Chikowski RS. Pires RM.

- Roger RF. Rosa MB. da Silveira RMB. Urrea-Valencia S. Cortez GV. da Silva VF.** 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* 66: 1033–1045.
- Madoui MA. Bertrand-Michel J. Gaulin E. Dumas B.** 2009. Sterol metabolism in the oomycete *Aphanomyces euteiches*, a legume root pathogen. *New Phytologist* 183: 291–300.
- Markovskaja S.** 2006. Saprolegniaceae (Peronosporomycetes) in Lithuania. The genus *Saprolegnia*. *Botanica Lithuania* 12: 1–43.
- Mastan SA.** 2015. Fungal infection in freshwater fishes of Andhra Pradesh, India. *African Journal of Biotechnology* 14: 530–534.
- Milanez AI. Pires-Zottarelli CLA. Schoenlein-Crusius IH.** 1994. Fungos aquáticos da região de Mata Atlântica no estado de São Paulo. *In: simpósio de ecossistemas da costa brasileira, 3, Serra Negra. Anais...* São Paulo: ACIESP, pp. 142–149.
- Milanez AI. Pires-Zottarelli CLA. Schoenlein-Crusius IH.** 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 5: Leptomitales (Rhipidiaceae). *Hoehnea* 23: 67–76.
- Milanez AI. Pires-Zottarelli CLA. Gomes AL.** (eds.) 2007. Brazilian zoosporic fungi. CNPq: São Paulo, 112 p.
- Miranda ML. Pires-Zottarelli CLA.** 2012. Oomicetos do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea* 39: 95–112.
- Molina FI. Jong SC. Ma G.** 1995. Molecular characterization and identification of *Saprolegnia* by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 65–74.
- Nascimento CA. Pires-Zottarelli CLA.** 2012. Diversidade de fungos zoospóricos da reserva biológica de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* 63: 587–611.

- Nagai M.** 1931. Studies on the Japanese saprolegniaceae. *The Botanical Magazine* 47: 133–137.
- Noga EJ.** 2010. *Fish disease: Diagnosis and Treatment*. 2 ed. John Wiley & Sons, Iowa.
- Oidtmann B. Schaefers N. Cerenius L. Söderhäll K. Hoffmann RW.** 2004. Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. *Veterinary Microbiology* 100: 269–82.
- Páramo MER. López-Lastra CC. García JJ.** 2014. Persistence and pathogenicity of a native isolate of *Leptolegnia chapmanii* against *Aedes aegypti* larvae in different anthropic environments *Biocontrol Science and Technology* 2: 238–243.
- Páramo MER. López-Lastra CC. García JJ. Fernandes EKK. Marreto RN. Luz C.** 2015. Effect of ultraviolet-A radiation on the production of *Leptolegnia chapmanii* (Saprolegniales: Saprolegniaceae) zoospores on dead *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and their larvicidal activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 133–135.
- Petrisko JE. Pearl CA. Pilliod. DS. Sheridan PP. Williams CF. Peterson CR. Bury RB.** 2008. Saprolegniaceae identified on amphibian eggs throughout the Pacific Northwest, USA, by internal transcribed spacer sequences and phylogenetic analysis. *Mycologia* 100: 171–180.
- Pires-Zottarelli CLA. Milanez AI. Schoenlein-Crusius IH.** 1995. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 3: Peronosporales. *Hoehnea* 22: 125–133.
- Pires-Zottarelli CLA. Milanez AI. Schoenlein-Crusius IH. Lohmann LG.** 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 4: Saprolegniales. *Hoehnea* 23: 39–66.

- Pires-Zottarelli CLA.** 1999. Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, São Paulo, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Pires-Zottarelli CLA. Rocha M.** 2007. Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 125–136.
- Pires-Zottarelli CLA. Gomes AL. de Oliveira JM. Milanez AI.** 2007. *Phragmosporangium uniseriatum* in Brazil. *Mycotaxon* 102: 179–182.
- Pires-Zottarelli CLA.** 2015. Saprolegniales *in*: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB94895>>. Acesso em: 10 Jan. 2016.
- Phillips AJ. Anderson VL. Robertson EJ. Secombes CJ. van West P.** 2008. New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 16: 13–19.
- Posada D.** 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Rezinciuc S. Sandoval-Sierra JV. Diéguez-Uribeondo J.** 2014. Molecular identification of a bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, *Salmo trutta*. *Fungal Biology* 118: 591–600.
- Riethmüller A. Weiss M. Oberwinkler F.** 1999. Phylogenetic studies of Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77: 1790–1800.

- Riethmüller A. Voglmayr H. Goker M. Oberwinkler F.** 2002. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94: 834–849.
- Robideau GP. de Cock AWAM. Coffey MD. Volglmayr H. Brouwer H. Bala K. Chitty DW. Desaulniers N. Eggertson QA. Gachon CM. Hu CH. Kupper FC. Rintoul TL. Sarhan E. Verstappen EC. Zhang Y. Bonants PJ. Ristaino JB. Levesque CA.** 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Research* 11: 1002–1011.
- Rogers AL. Beneke ES.** 1962. Two new species of *Achlya* in Brazil. *Rickia* 1: 243–249.
- Rogers AL. Milanez AI. Beneke ES.** 1970. Additional aquatic fungi from São Paulo State. *Rickia* 5: 93–110.
- Rocha M. Pires-Zottarelli CLA.** 2002. Chytridiomycota e Oomycota da Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. *Acta Botanica Brasilica* 16: 287–309.
- Romansic JM. Diez KA. Higashi EM. Johnson JE. Blaustein AR.** 2009. Effects of the pathogenic water mold *Saprolegnia ferax* on survival of amphibian larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 83: 187–193.
- Salvin SB.** 1942. Variations of specific and varietal character induced in isolate of *Brevilegnia*. *Mycologia* 42: 38–51.
- Sandoval-Sierra JV. Martín MP. Diéguez-Uribeondo J.** 2014. Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biology* 118: 559–578.
- Sandoval-Sierra JV. Diéguez-Uribeondo J.** 2015. A Comprehensive Protocol for Improving the description of Saprolegniales (Oomycota): Two Practical Examples

(*Saprolegnia aenigmatica* sp. nov. and *Saprolegnia racemosa* sp. nov.) PLoS ONE 10: e0132999.

Sarowar MN. van den Berg AH. McLaggan D. Young MR. van West P. 2013.

Saprolegnia strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. Fungal Biology 117: 752–763.

Sarowar MN. Saraiva M. Jessop CN. Lilje O. Gleason FH. van West P. 2014.

Infection strategies of pathogenic oomycetes in fish. *In: Freshwater Fungi and Fungal-like Organisms*, ed. EB. Gareth Jones EB, Hyde KD Pang KL (eds.). Walter de Gruyter GmbH: Berlin/Boston, pp. 217–243.

Schoch CL. Seifert KA. Huhndorf SM. Robert VA. Spouge JL. Lévesque CA.

Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS) 109: 6241–6246.

Schoenlein-Crusius IH. Pires-Zottarelli CLA. Milanez, AI. 1990. Sucessão fúngica

em folhas de *Quercus robur* L. (carvalho) submersas em um lago situado no município de Itapeceira da Serra, SP. Revista de Microbiologia 21: 61–67.

Schoenlein-Crusius IH. Pires-Zottarelli CLA. Milanez AI. 1992. Aquatic fungi in

leaves submerged in a stream in the Atlantic rainforest. Revista de Microbiologia 23: 167–171.

Schoenlein-Crusius IH. Milanez AI. 1998. Fungos zoospóricos (Mastigomycotina) da

Mata Atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, município de Santo André, SP. Revista Brasileira de Botânica 21: 177–181.

Scott WW. 1961. A revision of the genus *Aphanomyces*. Technical Bulletin Virginia

Agricultural Experiment Station 151: 1–95.

- Shanor L. Conover RA.** 1942. A new *Protoachlya*. American Midland Naturalist 28: 746–751.
- Seymour RL.** 1970. The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia 19: 1–124.
- Seymour RL.** 1984. *Leptolegnia chapmanii*, an oomycete pathogen of mosquito larvae. Mycologia 76: 670–674.
- de Souza JI. Gleason FH. Ansari MA. López-Lastra CC. Garcia JJ. Pires-Zottarelli CLA. Marano AV.** 2014. Fungal and oomycete parasites of Chironomidae, Ceratopogonidae and Simuliidae (*Culicomorpha*, *Diptera*). Fungal Biology Reviews 28: 13–23.
- Sparrow Jr. FK.** 1960. Aquatic Phycomycetes. 2ed. Ann Arbor, University of Michigan Press.
- Spencer MA. Vick MC. Dick MW.** 2002. Revision of *Aplanopsis*, *Pythiopsis*, and ‘subcentric’ *Achlya* species (Saprolegniaceae) using 18S rDNA and morphological data. Mycological Research 106: 549–560.
- Steciow MM. Lara E. Pillonel A. Pelizza SA. Lestani EA. Rossi GC. Belbahri L.** 2013. Incipient loss of flagella in the genus *Geolegnia*: the emergence of a new clade within *Leptolegnia*? IMA Fungus 4: 169–175.
- Steciow MM. Lara H. Paul C. Pillonel A. Belbahri L.** 2014. Multiple barcode assessment within the *Saprolegnia-Achlya* clade (Saprolegniales, Oomycota, Straminipila) brings order in a neglected group of pathogens. IMA Fungus 5: 439–448.
- Strand DA. Jussila J. Viijamaa-Dirks S. Kokko H. Makkonen J Holst-Jensen A. Viljugrein H. Istad TV.** 2012. Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. Veterinary Microbiology 160: 99–107.

Tamura K. Stecher G. Peterson D. Filipski A. Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

Torto-Alalibo T. Tian M. Gajendran K. Waugh ME. van West P. Kamoun S. 2005. Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiology* 5: 46.

Urban MC. Lewis LA. Fučíková K. Cordone A. 2015. Population of origin and environment interact to determine oomycete infections in spotted salamander populations. *Oikos* 124: 274–284.

van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20: 99–104.

Ziegler AW. 1948. A new species of *Achlya*. *Mycologia* 40: 336–341.

ANEXO II. Sequências depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas do presente estudo. *: Dados obtidos do GenBank, o qual possui trabalhos que não foram publicados. **: Algumas mudanças consideradas para as análises aqui apresentadas

Identificação GenBank	Número GenBank	Número de coleção	Depositante/autor*	Mudança na identificação**
<i>Achlya caroliniana</i>	AF218184		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. caroliniana</i>	AF119575	AR 13	Riethmüller et al. (1999)	
<i>A. colorata</i>	AF119577	CBS 54567	Riethmüller et al. (1999)	
<i>A. crenulata</i>	AF218192		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. flagellata</i>	AF218180		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. klebsiana</i>	AF119579	CBS 10149	Riethmüller et al. (1999)	
<i>A. klebsiana</i>	AF218191		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. oligacantha</i>	AF218175		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. papillosa</i>	AF218173		Leclerc et al. (2000)	<i>Newbya recurva sensu</i> Sepencer et al. (2002)
<i>A. papillosa</i>	AF119580	CBS 10152	Riethmüller et al. (1999)	<i>Newbya recurva sensu</i> Sepencer et al. (2002)
<i>A. racemosa</i>	JX115214	CBS 10338	Robideau et al. (2014)	
<i>A. racemosa</i>	AF218178		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. radiosa</i>	JX115215	CBS 54767	Robideau et al. (2014)	
<i>A. recurva</i>	AF218189		Leclerc et al. (2000)	
<i>A. spinosa</i>	AF119583	AR 95	Riethmüller et al. (1999)	<i>Newbya spinosa sensu</i> Spencer et al. (2002)
<i>A. treleaseana</i>	AF119584	CBS 57567	Riethmüller et al. (1999)	
<i>Aphanomyces astaci</i>	JX115216	CBS 121537	Robideau et al. (2014)	
<i>A. astaci</i>	XR717100	APO 3	Russ et al. (2013)	
<i>A. astaci</i>	AF235940	uv Soderhall K.	Petersen & Rosendahl (2000)	
<i>A. cladogamus</i>	HQ665056	CBS 10829	Robideau et al. (2011)	
<i>A. cochlioides</i>	HQ665241	CBS 47771	Robideau et al. (2011)	
<i>A. euteiches</i>	AF235939	ATCC 201684	Petersen & Rosendahl (2000)	

Continua.

ANEXO II. Sequências depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas do presente estudo. *: Dados obtidos do GenBank, o qual possui trabalhos que não foram publicados. **: Algumas mudanças consideradas para as análises aqui apresentadas

Identificação GenBank	Número GenBank	Número de Coleção	Depositante/autor*	Mudança na identificação**
<i>Aphanomyces euteiches</i>	HQ665129	CBS 15473	Robideau et al. (2011)	
<i>A. euteiches</i>	AY647190	MAFF 305549	Phadee et al. (2004)	
<i>A. euteiches</i>	HQ665132	CBS 15673	Robideau et al. (2011)	
<i>A. laevis</i>	HQ665242	CBS 47871	Robideau et al. (2011)	
<i>A. laevis</i>	AF119586	AR 47	Riethmüller et al. (1999)	
<i>A. laevis</i>	AY283646	IA 0475	Phadee et al. (2004)	
<i>A. laevis</i>	KP006453	CCIBt 4070	Jesus et al. (2014)	
<i>A. piscicida</i>	AF235941	njm 9211	Petersen & Rosendahl (2000)	
<i>A. repetans</i>	HQ395662	CBS 126886	Liu & Chen (2010)	
<i>A. repetans</i>	HQ395671	CBS 126887	Liu & Chen (2010)	
<i>A. salsuginosus</i>	JQ070132	ATCCMYA4775	Gujjari et al. (2011)	
<i>A. sinensis</i>	JQ070142	ATCCMYA4825	Gujjari et al. (2011)	
<i>A. stellatus</i>	AY455774	IA 009	Phadee et al. (2003)	
<i>A. stellatus</i>	AF119587	AR 51	Riethmüller et al. (1999)	
<i>Aplanes androgynus</i>	AF119588	AR 46	Riethmüller et al. (1999)	
<i>Aplanopsis spinosa</i>	AF119589	CBS 11261	Riethmüller et al. (1999)	<i>Achlya ornata sensu</i> Jonhson et al. (2005) / <i>Newbya pascuicula sensu</i> Spencer et al. (2002)
<i>Brevilegnia bispora</i>	AF119591	CBS 56967	Riethmüller et al. (1999)	
<i>B. bispora</i>	AF235942	CBS 56867	Petersen & Rosendahl (2000)	
<i>Calyptralegnia achlyoides</i>	AF119593	AR 05	Riethmüller et al. (1999)	
<i>Dictyuchus monosporus</i>	AF119595	CBS 46781	Riethmüller et al. (1999)	

Continua.

ANEXO II. Sequências depositadas no Genbank e utilizadas nas análises filogenéticas do presente estudo. *: Dados obtidos do GenBank, o qual possui trabalhos que não foram publicados. **: Algumas mudanças consideradas para as análises aqui apresentadas

Identificação GenBank	Número GenBank	Número de coleção	Depositante/autor*	Mudança na identificação**
<i>Geolegnia helicoides</i>	KF656776		Steciow et al. (2013)	
<i>Leptolegnia caudata</i>	HQ665287	CBS 68069	Robideau et al. (2011)	
<i>L. caudata</i>	AF218176	CBS 52387	Leclerc et al. (2000)	
<i>Leptolegnia</i> sp.	AY310502	CBS 17786	Oidtmann et al. (2004)	<i>Saprolegnia. aenigmatica</i> Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015)
<i>Newbya dichotoma</i>	KP098361	MB 808617	Steciow et al. (2014)	
<i>Pachymetra chaunorhiza</i>	AF119598	CBS 96087	Riethmüller et al. (1999)	
<i>Plectospira myriandra</i>	HQ665247	CBS 52387	Robideau et al. (2011)	
<i>Protoachlya paradoxa</i>	HQ665135	CBS 15845	Robideau et al. (2011)	
<i>P. paradoxa</i>	DQ393493	ATCC44892	Hulvey et al. (2007)	
<i>P. paradoxa</i>	DQ393491	CBS 15845	Hulvey et al. (2007)	
<i>Pythium helicandrum</i>	HQ665225	CBS 39354	Robideau et al. (2011)	
<i>P. middletonii</i>	AF119608	CBS 52874	Riethmüller et al. (1999)	
<i>Saprolegnia anisospora</i>	KF718193	SAP 0270	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. asterophora</i>	HQ643975	CBS 53167	Robideau et al. (2011)	
<i>S. asterophora</i>	KF718178	SAP 1296	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. australis</i>	KF748610	SAP 2643	Rezinciuc et al. (2014)	
<i>S. australis</i>	KF748589	SAP2612	Rezinciuc et al. (2014)	
<i>S. delica</i>	KF420222	ABDN 26	Sarowar et al. (2013)	
<i>S. delica</i>	KF420208	ABDN 01	Sarowar et al. (2013)	
<i>S. diclina</i>	KF717744	SAP 0229	Sandoval-Sierra et al. (2014)	

Continua.

ANEXO II. Sequências depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas do presente estudo. *: Dados obtidos do GenBank, o qual possui trabalhos que não foram publicados. **: Algumas mudanças foram consideradas para as análises aqui apresentadas.

Identificação GenBank	Número GenBank	Número de coleção	Depositante/autor*	Mudança na identificação**
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717796	SAP 1023	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. eccentrica</i>	KF718140	SAP 1288	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. eccentrica</i>	HQ665151	CBS 21135	Robideau et al. (2011)	
<i>S. eccentrica</i>	AF119611	CBS 55167	Riethmüller et al. (1999)	
<i>S. eccentrica</i>	AB219376	CBS 110061	Inaba & Tokumasu (2005)	<i>Saprolegnia anisospora sensu</i> Sandoval-Sierra et al. (2014)
<i>S. ferax</i>	HQ665062	CBS 1734	Robideau et al. (2011)	
<i>S. ferax</i>	KF717883	SAP 0157	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. ferax</i>	HQ665142	CBS 17342	Robideau et al. (2011)	
<i>S. furcata</i>	KF718143	SAP 1294	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. lapponica</i>	HQ665184	CBS 28438	Robideau et al. (2011)	<i>S. ferax sensu</i> Sandoval-Sierra et al. (2014)
<i>S. litoralis</i>	KF718048	CBS 53567	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. megasperma</i>	HQ665251	CBS 53267	Robideau et al. (2011)	
<i>S. megasperma</i>	KF718186	SAP 1287	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. megasperma</i>	KF718187	SAP 1373	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. monilifera</i>	KF718131	SAP 1450	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. monilifera</i>	KF718133	SAP 1470	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. monoica</i>	HQ643998	CBS 59967	Robideau et al. (2011)	
<i>S. parasitica</i>	KF717839	SAP 0208	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. parasitica</i>	HQ665196	CBS 30032	Robideau et al. (2011)	
<i>S. parasitica</i>	HQ644000	CBS 54067	Robideau et al. (2011)	<i>S. aenigmatica sensu</i> Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015)
<i>S. parasitica</i>	HQ665074	CBS 113187	Robideau et al. (2011)	

Continua

ANEXO II. Sequências depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas do presente estudo. *: Dados obtidos do GenBank, o qual possui trabalhos que não foram publicados. **: Algumas mudanças consideradas para as análises aqui apresentadas.

Identificação GenBank	Número GenBank	Número de coleção	Depositante/autor*	Mudança na identificação**
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717864	SAP 1091	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. semihypogyna</i>	AY647194	IA 1424	Phadee et al. (2004)	
<i>S. semihypogyna</i>	AB219395	CBS 109568	Inaba & Tokumasu (2005)	
<i>S. subterranea</i>	KF718124	SAP 1293	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>S. subterranea</i>	HQ665078	CBS 113343	Robideau et al. (2011)	
<i>S. terrestris</i>	KF718134	SAP 1285	Sandoval-Sierra et al. (2014)	
<i>Saprolegnia</i> sp.	DQ393563	CBS 109568	Hulvey et al. (2007)	<i>Saprolegnia eccentrica sensu</i> Sandoval-Sierra et al. (2014)
<i>Saprolegnia</i> sp.	DQ393561	UNCW 380	Hulvey et al. (2007)	<i>S.furcata sensu</i> Sandoval-Sierra et al. (2014)
<i>Saprolegnia</i> sp.	DQ393558	UNCW 374	Hulvey et al. (2007)	<i>S.litoralis sensu</i> Sandoval-Sierra et al. (2014)
<i>Saprolegnia</i> sp.	DQ393523	UNCW2 59	Hulvey et al. (2007)	<i>S.terrestris sensu</i> Sandoval-Sierra et al. (2014)
<i>Saprolegnia</i> sp.	DQ393447	UNCW 217	Hulvey et al. (2007)	<i>S. aenigmatica sensu</i> Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015)
<i>Saprolegnia</i> sp.	KF718122	SAP 1209	Sandoval-Sierra et al. (2014)	<i>S. racemosa sensu</i> Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015)
<i>Saprolegnia</i> sp.	JQ974985	LR 11	Ault et al (2012)	<i>S. aenigmatica sensu</i> Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo (2015)
<i>Thraustotheca clavata</i>	HQ665268	CBS 55767	Robideau et al. (2011)	
<i>T. clavata</i>	HQ665213	CBS 34333	Robideau et al. (2011)	
<i>T. terrestris</i>	HQ665057	CBS 109851	Robideau et al. (2011)	

ANEXO I. Resultados obtidos do Algoritmo BLASTn para as sequências da região ITS do rDNA dos espécimes estudados

Coleção	Sequencia da Região ITS	Identidade	Espécie	Cobertura	Acesso
CCIBt 3993	<i>Achlya androgyna</i>	99%	<i>Aplanes androgynus</i>	98%	AB219374
CCIBt 3870	<i>A. caroliniana</i>	100%	<i>Achlya caroliniana</i>	100%	HQ643089
AVM 4	<i>A. caroliniana</i>	99%	<i>Achlya caroliniana</i>	99%	KF718203
CCIBt 2017	<i>A. caroliniana</i>	99%	<i>Achlya caroliniana</i>	95%	JX418018
CCIBt 3997	<i>A. crenulata</i>	96%	<i>Achlya crenulata</i>	94%	AF218157
CCIBt 3980	<i>A. flagellate</i>	99%	<i>Achlya flagellata</i>	99%	HQ643096
CCIBt 4079	<i>A. hypogyna</i>	100%	<i>Protoachlya</i> sp. Argentina	99%	EU551149
CCIBt 3984	<i>A. orion</i>	98%	<i>Achlya dubia</i>	99%	HQ643093
CCIBt 4100	<i>A. orion</i>	98%	<i>Achlya debaryana</i>	100%	KP098352
CCIBt 3996	<i>A. oviparvula</i>	97%	<i>Achlya caroliniana</i>	100%	HQ643089
CCIBt 3982	<i>A. primoachlya</i>	99%	<i>Achlya primoachlya</i>	99%	EU849168
AVM 1	<i>A. primoachlya.</i>	99%	<i>Achlya primoachlya</i>	99%	EU849168
CCIBt 4039	<i>A. radiosa</i>	99%	<i>Achlya radiosa</i>	94%	HQ643106
CCIBt 2309	<i>A. radiosa</i>	99%	<i>Achlya radiosa</i>	94%	HQ643106
CCIBt 3854	<i>Aphanomyces cladogamus</i>	99%	<i>Aphanomyces cladogamus</i>	92%	HQ643113
CCIBt 3994	<i>A. stellatus</i>	99%	<i>Aphanomyces stellatus</i>	96%	AM947029
CCIBt 4026	<i>Aphanomyces</i> sp.1	95%	<i>Aphanomyces cladogamus</i>	93%	HQ643113
CCIBt 4037	<i>Aplanopsis terrestris</i>	99%	<i>Aplanopsis terrestris</i>	96%	AB219375
CCIBt 3989	<i>Brevilegnia longicaulis</i>	93%	<i>Brevilegnia unisperma</i>	98%	HQ643129
CCIBt 3351	<i>B. minutandra</i>	100%	<i>Dictyuchus</i> sp.	94%	KJ470883
CCIBt 4028	<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	100%	<i>Dictyuchus</i> sp.	97%	JX418019
CCIBt 4108	<i>D. pseudodictyon</i>	99%	<i>Dictyuchus</i> sp.	95%	JX418019
CEP 010	<i>Leptolegnia chapmanii</i>	96%	<i>Leptolegnia</i> sp.	95%	KF766941
CEP 433	<i>L. chapmanii</i>	97%	<i>Leptolegnia</i> sp.	92%	KF766941
CCIBt 3991	<i>L. eccentrica</i>	91%	<i>Aphanomyces stellatus</i>	99%	AY310498
CCIBt 4125	<i>L. eccentrica</i>	91%	<i>Aphanomyces stellatus</i>	99%	AY310498
CCIBt 3986	<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>	91%	<i>Aphanomyces invadans</i>	99%	EU422990
CCIBt 4107	<i>P. uniseriatum</i>	92%	<i>Aphanomyces invadans</i>	99%	EU422990
CCIBt 2332	<i>P. uniseriatum</i>	92%	<i>Aphanomyces invadans</i>	99%	EU422990
CCIBt 3372	<i>Plectospira myriandra</i>	91%	<i>Plectospira myriandra</i>	94%	HQ643402
CCIBt 3992	<i>P. myriandra</i>	90%	<i>Plectospira myriandra</i>	99%	HQ643402
CCIBt 3985	<i>Pythiopsis irregularis</i>	91%	<i>Pythiopsis terrestris</i>	99%	HQ643406
AVM 2	<i>P. irregularis</i>	99%	<i>Pythiopsis terrestris</i>	97%	KP098350
CCIBt 3998	<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	99%	<i>Saprolegnia</i> sp.	98%	JQ974986
CCIBt 4106	<i>S. aenigmatica</i>	99%	<i>Saprolegnia parasitica</i>	100%	HQ644000
CCIBt 4099	<i>S. ferax</i>	99%	<i>Saprolegnia ferax</i>	100%	JN400035
CCIBt 4096	<i>S. semihypogyna</i>	100%	<i>Saprolegnia eccentrica</i>	100%	HQ643981
GHJ 1	<i>S. subterranea</i>	99%	<i>Saprolegnia subterranea</i>	99%	KF718124
AVM 3	<i>S. subterranea</i>	99%	<i>Saprolegnia subterranea</i>	99%	KF718124
CCIBt 3988	<i>S. truncata</i>	92%	<i>Saprolegnia eccentrica</i>	100%	HQ643981
CCIBt 4027	<i>S. milanezii</i> sp. nov.	96%	<i>Saprolegnia semihypogyna</i>	97%	AY647194
CCIBt 4001	<i>S. milanezii</i> sp. nov.	96%	<i>Saprolegnia semihypogyna</i>	99%	AY647194
CCIBt 3983	<i>Saprolegnia</i> sp.2	99%	<i>Saprrolegnia</i> sp.	99%	DQ393538
CCIBt 1234	<i>Saprolegnia</i> sp.4	99%	<i>Saprolegnia semihypogyna</i>	98%	AY647194
CCIBt 1991	<i>Saprolegnia. sp.5</i>	98%	<i>Pythiopsis cimosa</i>	92%	EU240083