

Sarah Cristina de Oliveira da Paixão

**Estudo morfológico e molecular de espécies
do filo Oomycota isoladas de cultivo de
truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*
Walbaum) em Campos do Jordão, estado
de São Paulo, Brasil**



São Paulo
2021

SARAH CRISTINA DE OLIVEIRA DA PAIXÃO

**Estudo morfológico e molecular de
espécies do filo Oomycota isoladas de
cultivo de truta arco-íris (*Oncorhynchus
mykiss* Walbaum) em Campos do Jordão,
estado de São Paulo, Brasil**

**SÃO PAULO
2021**

SARAH CRISTINA DE OLIVEIRA DA PAIXÃO

**Estudo morfológico e molecular de espécies do
filo Oomycota isoladas de cultivo de truta
arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) em
Campos do Jordão, estado de São Paulo,
Brasil**

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

SÃO PAULO

2021

SARAH CRISTINA DE OLIVEIRA DA PAIXÃO

**Estudo morfológico e molecular de espécies do
filo Oomycota isoladas de cultivo de truta
arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) em
Campos do Jordão, estado de São Paulo,
Brasil**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR 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

"Tenha coragem e seja gentil. Onde existe gentileza, existe bondade!"

Cinderela

Para meu filho, Eric Tiago, dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus pelo prazer desta caminhada, me dando muito mais além do que eu pedi.

Agradeço pelo presente de ser mãe, sendo amparada em todos os momentos. Sou grata pela saúde dos que ainda estão por aqui!

À minha família, pelo carinho, cuidado e preocupação comigo!

Ao meu esposo e filho, pela paciência, carinho e apoio. Nada disso teria acontecido sem o amor de vocês em minha vida.

À minha orientadora, Dra. Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli, por assumir este projeto comigo, por me ensinar muito ao longo destes anos de parceria. Agradeço o exemplo de profissionalismo e dedicação que levarei para toda minha vida. Agradeço pela confiança, amizade e o carinho em todos estes anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento concedido (Processo 152741/2016).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento concedido (Processo 2016/18787-5).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) pelo financiamento concedido.

À Dra. Yara Aiko Tabata, pesquisadora da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD), por todo apoio e auxílio, o qual foi essencial para a realização deste projeto. Agradeço também aos funcionários e estudantes da UPD que nos receberam em todas as visitas, ajudando nas coletas com muita gentileza.

Ao senhor Mineo, proprietário da Unidade Particular (UP), bem como seus funcionários, que gentilmente nos receberam e ajudaram durante o período de coleta.

Às pesquisadoras do Instituto de Pesca (IP), Dra. Neuza Sumico Takahashi e Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério, por nos receber e estabelecer conexão entre nós e a UPD, o que permitiu a elaboração deste projeto.

À pesquisadora do IP, Dra. Cacilda Thais Janson Mercante, pelas ideias e contribuições para este projeto durante a qualificação do doutorado.

Aos pesquisadores Dr. José Vladimir Sandoval-Sierra e Dr. Javier Diégues-Uribeondo do Real Jardín Botánico de Madrid, Espanha, pela colaboração com a obtenção de dados moleculares.

Ao Dr. Eduardo Pereira Cabral Gomes pelo auxílio nas análises estatísticas.

Às bolsistas de Treinamento Técnico, Débora Rodrigues da Silva Colombo e Poliana de Oliveira Ventura, pelo auxílio no laboratório de biologia molecular.

Ao Instituto de Botânica (IBt) pela infraestrutura para execução deste trabalho.

À uma luz infinita de positividade, Dra. Ana Lucia de Jesus, companheira de jornada e de laboratório, sempre disponível para ajudar, fazendo com prazer, agradeço por tudo, mesmo sabendo que nunca poderei pagar toda sua ajuda (está na conta!).

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 durante este período pelo atendimento e prestação de serviços.

À estagiária FUNDAP e amiga Ana Lucia Vardiero Ribeiro pela ajuda nas coletas, também por se tornar parte da minha vida pessoal. Foi muito bom conhecer você nesta caminhada.

À funcionária e amiga Dra. Marcela Castilho Boro, por ajudar nas coletas, bem como pela ajuda com os espécimes de oomicetos, sobretudo por se tornar uma amiga,

agradeço por existir, você ilumina o Núcleo de Pesquisa em Micologia. Vou sentir saudades!

Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisa em Micologia: Gustavo, Mauro, Ricardo e Viviana, por todos os bons momentos de vivência no núcleo. Este lugar não seria o mesmo sem vocês!

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

Sarah C. O. da Paixão

RESUMO

O cultivo intensivo de peixes em espaço confinado interfere na ecologia do ambiente devido às interações tróficas e aumento da matéria orgânica, o que pode favorecer o surgimento de doenças causadas por oomicetos, os quais apresentam eficiência na dispersão em ambientes aquáticos. A saprolegniose, doença causada por espécies do gênero *Saprolegnia*, é a mais conhecida das parasitoses causada por oomicetos, com registros frequentes em salmonídeos, nas diferentes fases de desenvolvimento do peixe. No Brasil, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) foi introduzida na década de 40, sendo hoje um exemplo de sucesso na criação de peixes em regiões frias e montanhosas do país. No entanto, não há conhecimento sobre a ocorrência de oomicetos nestes sistemas de cultivo no país, os quais podem afetar a qualidade do pescado e interferir na produção. Em vista disto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a riqueza e a diversidade dos representantes do filo Oomycota, em duas truticulturas de Campos do Jordão, no período de um ano (agosto/novembro de 2016 e março/junho de 2017). Para isto, foram coletadas amostras da água que abastecem os sistemas de cultivo; dos tanques de criação, nas diferentes fases de desenvolvimento da truta, bem como da água de entrada e saída dos sistemas. Ovos e peixes mortos foram coletados, quando existentes. Em laboratório, amostras de água foram tratadas pelo método de iscagem múltipla, a fim de se obter o maior número de espécimes. Micélio de oomicetos aparente nos ovos, bem como obtido pela raspagem da epiderme de peixes mortos coletados, foi inoculado em meios de cultura específicos. Por meio de estudos morfológicos e moleculares (regiões ITS, LSU e/ou SSU do rDNA), foram registrados 535 espécimes de oomicetos, de 276 amostras de água analisadas, bem como dos peixes mortos e ovos colonizados, os quais são pertencentes

às ordens Olpidiopsidales *s.l.*, Peronosporales *s.l.* e Saprolegniales. A ordem Saprolegniales foi a melhor representada no estudo, com o gênero *Achlya* sendo o mais abundante. A distribuição dos oomicetos nos sistemas estudados permite supor que a água é o principal meio de dispersão destes organismos, os quais estiveram presentes em maior abundância em épocas mais frias do período de coleta, no entanto, sem diferença significativa com relação às épocas mais quentes ($p < 0,05$). O cálculo da estrutura da comunidade mostrou ser a micota de oomicetos diversa, com 86% de similaridade entre ambas truticulturas. Dos espécimes obtidos nas duas truticulturas, 33 táxons foram identificados, com 23 em nível específico, todos mencionados pela primeira vez em Campos do Jordão. *Newbya oblongata*, *Pythiogeton abundans* e *Phytopythium litorale* são primeiras citações para o Brasil, e *Aphanomyces brasiliensis* uma espécie nova para a ciência. Pela primeira vez foram registrados oomicetos em truticulturas no país, ampliando o conhecimento destes organismos em pisciculturas no Brasil, com análise em todo o sistema de cultivo da truta, possibilitando compreender a dinâmica destes organismos no sistema e a identificação de potenciais patógenos.

Palavras-chave: Diversidade, oomicetos, truticultura

ABSTRACT

The intensive cultivation of fish in confined spaces interferes with the ecology of the environment due to trophic interactions and increased organic matter, which can favor the emergence of diseases caused by oomycetes, which are efficient in dispersion in aquatic environments. Saprolegniosis, a disease caused by species of the genus *Saprolegnia*, is the best known of diseases caused by oomycetes, with frequent records in salmonids, in the different stages of fish development. In Brazil, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) was introduced in the 1940s, and today it is a successful example of fish farming in cold and mountainous regions of the country. However, there is no knowledge about the occurrence of oomycetes in these farming systems in the country, which can affect the quality of the fish and interfere with the production. In view of this, the present study had as main objective to evaluate the richness and the diversity of the representatives of the phylum Oomycota, in two trout farm of Campos do Jordão, in the period of one year (August/November 2016 and March/June 2017). For this, water samples that supply the cultivation systems were collected; of the breeding tanks, in the different stages of development of the trout, as well as of the water of entrance and exit of the systems. Eggs and dead fish were collected, when present. In laboratory, water samples were treated by the multiple baiting technique, in order to obtain the largest number of specimens. Mycelium of oomycetes apparent in the eggs, as well as obtained by scraping the epidermis of dead fish was inoculated in specific culture media. Through morphological and molecular studies (ITS, LSU and/or SSU regions of the rDNA), 535 specimens of oomycetes were recorded, from 276 water samples analysed, as well as dead fish and colonized eggs, which belong to the orders Olpidiopsidales *s.l.*, Peronosporales *s.l.* and Saprolegniales. The order Saprolegniales was the best represented in the study, with genus *Achlya* being

the most abundant. The distribution of oomycetes in the studied systems allows us to assume that water is the main means of dispersion of these organisms, which were present in greater abundance in colder periods of the sampling, however, without significant difference in relation to the warmer seasons ($p < 0,05$). The community structure calculated showed to be diverse the mycota, with 86% similarity between both truticultures. From the specimens obtained in both truticultures, 33 taxa were identified, 23 at specific level, all mentioned for the first time for Campos do Jordão. *Newbya oblongata*, *Pythiogeton abundans* and *Phytopythium litorale* are first citations for Brazil, and *Aphanomyces brasiliensis* a new species for science. Oomycetes were registered for the first time in trout farms in the country, expanding the knowledge of these organisms in fish farms in Brazil, with analysis throughout the trout farm system, making it possible to understand the dynamics of these organisms in the system and the identification of potential pathogens.

Keywords: Diversity, oomycetes, trout farm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Taxonomia e ecologia do filo Oomycota	15
1.2. O filo Oomycota na piscicultura	20
1.3. Registro das espécies do filo Oomycota no Brasil	22
1.4. O cultivo da truta arco-íris no Brasil	24
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. HIPÓTESES	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Áreas de estudo	28
4.2. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD)	28
4.3. Unidade particular (UP)	30
4.4. Coletas nas truticulturas estudadas	30
4.4.1. Periodicidade das coletas nas truticulturas estudadas	30
4.4.2. Coleta na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD)	32
4.4.3. Coleta na Unidade Particular (UP)	35
4.5. Procedimento das coletas, processamento das amostras e identificação morfológica dos espécimes de oomicetos coletados nas truticulturas estudadas	35
4.6. Análises moleculares	37
4.6.1. Produção de biomassa dos oomicetos para extração de DNA	37
4.6.2. Extração, amplificação e purificação do DNA	39
4.6.3. Sequenciamento das amostras	41
4.7. Tratamento das sequências obtidas e análises filogenéticas	41
4.8. Análise da comunidade dos oomicetos presentes nas diferentes amostras das truticulturas estudadas	42
4.9. Variação da temperatura do ar nos meses de coleta	43
4.10. Métodos de preservação dos espécimes identificados	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Variação da temperatura do ar (°C) nos meses de coleta	44
5.2. Ocorrência dos oomicetos nas truticulturas estudadas	45

5.3. Distribuição dos oomicetos, durante o período de coleta, nas truticulturas estudadas	55
5.4. Riqueza em espécies de oomicetos, no período de estudo, nas truticulturas estudadas	56
5.4.1. Saprolegniales nas truticulturas estudadas	60
5.4.1.1. Família Achlyaceae	60
5.4.1.2. Família Saprolegniaceae.....	68
5.4.1.3. Família Verrucalvaceae.....	77
5.4.2. Peronosporales <i>s.l.</i> nas truticulturas estudadas	82
5.4.2.1. Família Peronosporaceae <i>s.l.</i>.....	82
5.4.2.2. Família Pythiaceae <i>s.l.</i>	85
5.4.3. Olpidiopsidales <i>s.l.</i> nas truticulturas estudadas.....	93
5.4.3.1. Família Olpidiopsidaceae <i>s.l.</i>	93
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8. ANEXOS	141

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia e ecologia do filo Oomycota

O filo Oomycota compreende um grupo monofilético de organismos zoospóricos heterotróficos do Reino Straminipila, juntamente com outros organismos que são eucariontes e apresentam estruturas flageladas em determinada fase do ciclo de vida, tais como as algas marrons e diatomáceas planctônicas (Beakes & Thines 2017, Adl *et al.* 2018). Sua morfologia abrange ampla diversificação, que inclui espécies com talo holocárpico (unicelular) até eucárpico (micelial); quando micelial possuem hifas cenocíticas, com formação de septos para delimitação das estruturas reprodutivas. A reprodução assexuada é realizada por meio da produção de zoosporângios e zoósporos, sendo a reprodução sexuada quase sempre heterogamética, podendo o talo agir como um gametângio (Alexopoulos *et al.* 1996, Beakes *et al.* 2015, Beakes & Thines 2017). A produção de zoósporos biflagelados, com um longo flagelo tipo tínzel (flagelo com mastigonemas) e um curto flagelo tipo chicote, conferem a estes organismos mobilidade com mecanismos específicos de locomoção, o que reflete na facilidade quanto à sua dispersão nos ambientes aquáticos (Alexopoulos *et al.* 1996, Liu *et al.* 2006, Walter & West 2007, Beakes & Sekimoto 2009, Gleason & Lilje 2009). Exceções incluem algumas poucas espécies, com a maioria inseridas no grupo considerado basal dentre os oomicetos, como por exemplo, a ordem Olpidiopsidales *s.l.* (Strittmatter *et al.* 2009, Marano *et al.* 2017), as quais apresentam espécies com produção de esporos aplanospóricos, sugerindo uma perda de complexidade estrutural destes organismos ao adotar um estilo de vida parasita (Lara & Belbahri 2011, Judelson *et al.* 2012, Steciow

et al. 2013). Até o momento, *Geolegnia* é o único gênero, dentro da ordem Saprolegniales, no qual são mencionados aplanósporos (Steciow *et al.* 2013).

No passado estes organismos eram relacionados aos fungos, com os quais compartilham características convergentes, como a formação de micélio, hábito nutricional e mecanismos de infecção, sendo, muitas vezes, denominados organismos semelhantes aos fungos ou pseudofungos (Marano *et al.* 2011, Beakes *et al.* 2015). No entanto, possuem características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas bem definidas que comprovadamente os distinguem dos fungos, tais como produção de talo diplóide, reprodução oogâmica, presença de celulose na parede celular, mitocôndrias com cristas tubulares, síntese da lisina pela via ácido diaminopimélico, ao lado de seu posicionamento molecular (Alexopoulos *et al.* 1996, Beakes *et al.* 2012, 2015, Adl *et al.* 2018).

Oomicetos são comumente encontrados em vida livre, na água e no solo, com distribuição cosmopolita, apresentando muitas vezes estruturas de resistência que lhes permitem sobrevivência a ambientes quase inóspitos (Beakes & Thines 2017, Hassett *et al.* 2019). No contexto ecológico, estes organismos podem atuar como sapróbios, agindo como importantes agentes decompositores e participando do processo de degradação de matéria orgânica (Alexopoulos *et al.* 1996, Dick 2001, Johnson *et al.* 2002). Ao longo do processo evolutivo, várias espécies tornaram-se patógenas altamente especializadas de plantas e animais, inclusive de outros oomicetos (Sekimoto *et al.* 2009, Klochkova *et al.* 2016, Buaya *et al.* 2019). Contudo, as espécies mais estudadas são as sapróbias, com patologia oportunista, tanto em plantas quanto em animais, e conhecidas por atuarem numa infecção secundária, ou se aproveitando de um processo que resulte da deficiência imunológica do hospedeiro (Philips *et al.* 2008, Diéguez-Uribeondo *et al.* 2009, Beakes *et al.* 2012, 2014). Estudos sugerem que

oomicetos patogênicos são subestimados como patógenos secundários, apesar de apresentarem mecanismos de infecção altamente especializados, semelhantes a muitos patógenos primários (Pickering & Willoughby 1982, van den Berg *et al.* 2013, Duan *et al.* 2018).

Uma das mais recentes classificações taxonômicas é a proposta por Beakes *et al.* (2014), os quais fizeram uma reorganização taxonômica dos representantes do filo Oomycota, com base em estudos morfológicos e moleculares (especialmente a região LSU do DNA ribossômico - rDNA). Nesta classificação, duas principais classes são aceitas, Saprolegniomycetes, com as ordens Atkiniellales, Leptomitales e Saprolegniales, e Peronosporomycetes com Albuginales, Peronosporales *s.l.* e Rhipidiales. Além disso, foram deixadas como *incertae sedis* as ordens Eurychasmiales, Haptoglossales, Olpidiopsidales *s.l.* e Haliphthorales, consideradas grupos basais dentro do filo, dentre os quais, há diversos parasitas obrigatórios, cujos estudos são escassos, o que limita a compreensão taxonômica destes organismos (Sekimoto *et al.* 2009, Beakes & Thines 2017). O gênero *Olpidiopsis*, por exemplo, da ordem Olpidiopsidales, apresentam espécies parasitas de algas marinhas cultiváveis, conhecidamente estudadas por causarem perdas na produção destas algas (Sekimoto *et al.* 2009, Kim *et al.* 2014, Klochkova *et al.* 2016). A espécie tipo, *Olpidiopsis saprolegniae*, é um endoparasita de água doce, com seu recente sequenciamento mostrando distanciamento filogenético das espécies marinhas, o que comprova ser o gênero polifilético (Beakes & Thines 2017, Buaya *et al.* 2019, Buaya & Thines 2020).

Dentro da classe Peronosporomycetes estão incluídas diversas espécies fitopatogênicas, algumas com relevantes danos em plantas de interesse econômico, sendo os mais conhecidos e estudados táxons dentre os oomicetos (Martin & Loper 1999, Thines 2014). Como exemplo, *Pythium aphanidermatum* é responsável por danos

em plantações de tomate, pepino e raiz de alface (Utkhede *et al.* 2009, Al-Hussini *et al.* 2019, Halo *et al.* 2019), bem como *Phytophthora litorale* e *Pp. vexans*, os quais são relatados causando podridão da raiz de diversas plantas (Dervis *et al.* 2020, Mert *et al.* 2020, Prencipe *et al.* 2020). A espécie *Phytophthora infestans* ficou mundialmente conhecida por causar o que ficou intitulado por “requeima da batata”, doença em plantações de batata que apresentam rápida disseminação e alto potencial destrutivo (Haverkort *et al.* 2009, Nowicki *et al.* 2011). No entanto, dentro de Peronosporomycetes também há relato de parasitismo em animais, como é o caso de *Pythium insidiosum*, espécie que causa a chamada pitiose em equinos, caninos, ovinos e humanos (Grooters 2003, Bosco *et al.* 2005, Santurio *et al.* 2006, Gaastra *et al.* 2010, Medonza & Vilela 2013, Chitasombat *et al.* 2020, do Carmo *et al.* 2021). Já em Saprolegniomycetes estão presentes diversas espécies de oomicetos conhecidas por parasitar animais, com registros em insetos (Lopes-Lastra *et al.* 2004, Páramo *et al.* 2014, 2015, Montalva *et al.* 2016), anfíbios (Pessier 2002, Petrisko *et al.* 2008, Ault *et al.* 2012, Gleason *et al.* 2014), crustáceos (Söderhöl *et al.* 1991, Czezugha *et al.* 2002, Rezinciuc *et al.* 2016), répteis (Lau *et al.* 2020) e peixes (Krishna *et al.* 1990, Noga 1996, 2010, Fregeneda-Grandes *et al.* 2001, 2007, Hussein & Hatai 2002, van den Berg *et al.* 2013, Kiziewicz *et al.* 2013, Carraschi *et al.* 2018, Lau *et al.* 2018, Sarowar *et al.* 2019a, b, Dzyuba *et al.* 2020, do Nascimento *et al.* 2020), sendo a maioria das espécies pertencentes à Saprolegniales, para os quais as pesquisas com parasitismo são menos expressivas, quando comparadas com os fitopatógenos, entretanto não menos importantes.

Embora espécies do filo Oomycota sejam consideradas de fácil cultivo, há relativa dificuldade no trabalho de identificação taxonômica destes organismos, que exige minuciosos registros morfológicos do espécime, por vezes necessitando de longos períodos de observação das principais estruturas de reprodução. O problema ocorre

quando alguns critérios morfológicos se tornam ausentes, ambíguos ou altamente variáveis (Steciow *et al.* 2013, Sandoval-Sierra *et al.* 2014b, Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015), como é o caso de espécies patogênicas que muitas vezes não apresentam estruturas sexuais, fundamentais para identificação morfológica em nível de espécie, fazendo assim com que sejam citadas somente em nível de gênero (Kitancharoen & Hatai 1996, Tavares-Dias *et al.* 2002, Pinheiro *et al.* 2015, Hamad & Mustafa 2018, Raputean *et al.* 2019, Good *et al.* 2020). Neste sentido, a utilização de ferramentas moleculares para os estudos taxonômicos dos oomicetos tem contribuído na identificação das espécies, bem como para a sistemática do grupo, com os principais marcadores utilizados sendo as regiões ITS do DNA ribossômico (rDNA), recomendada para utilização na identificação em nível específico (Robideau *et al.* 2011, de la Bastide *et al.* 2015, Thoen *et al.* 2015), e o gene LSU do rDNA, melhor utilizado nos estudos filogenéticos de gênero ou táxons superiores (Riethmüller *et al.* 1999, 2002, Leclerc *et al.* 2000, Beakes *et al.* 2014). Ambas as regiões gênicas estão presentes nas principais filogenias de representantes do filo (Riethmüller *et al.* 1999, 2002, Leclerc *et al.* 2000, Robideau *et al.* 2011, Beakes *et al.* 2014, de la Bastide *et al.* 2015, Jesus *et al.* 2015, Thoen *et al.* 2015, Gonçalves *et al.* 2016, Rocha 2016, Rocha *et al.* 2016a, b, Rocha *et al.* 2018b) e, por sua vez, apresentando-se em maior quantidade nos bancos de dados por serem as regiões mais utilizadas em pesquisas com oomicetos no mundo (Robideau *et al.* 2011, Beakes *et al.* 2014, Rocha *et al.* 2018b). Com menor frequência, as regiões COI do DNA mitocondrial (mDNA), e também a região SSU do rDNA, são utilizadas em estudos moleculares para alguns poucos gêneros e espécies de oomicetos (Gunderson *et al.* 1987, Molina *et al.* 1995, Hudspeth *et al.* 2000, Spencer *et al.* 2002, Lara & Belbahri 2011, Baten *et al.* 2014, Gonçalves *et al.* 2016).

1.2. O filo Oomycota na piscicultura

Os peixes representam mais da metade dos vertebrados presentes em ecossistemas aquáticos, sendo utilizados para o sustento de inúmeras famílias, com o setor industrial da piscicultura empregando milhões de pessoas ao redor do mundo (FAO 2014, 2015, Zhao *et al.* 2014, Anuário Peixe BR 2020). No entanto, doenças na piscicultura são comuns e representam a maior parte das significativas perdas econômicas do setor (Gozlan *et al.* 2014, Reyes & Nunes 2017). O cultivo de peixes, em espaço confinado e controlado, normalmente com a criação de uma única espécie, tornou-se uma alternativa ao controle do surgimento de doenças, porém, esta prática interfere, muitas vezes, de forma negativa no equilíbrio do ambiente. As bactérias são apontadas como as principais responsáveis por doenças nos peixes, seguidas pelos fungos (*sensu stricto* e *sensu lato*), os quais ocasionam danos na criação e consequentes perdas econômicas (Noga 1993, Ramaiah 2006, van West 2006, Bruno *et al.* 2011, Gonçalves & Gagnon 2011, Awal & Campobasso 2015, Liu *et al.* 2015, Valladão *et al.* 2015, Grossart & Rojas-Jimenez 2016, Vollset 2019). Estudos em diferentes partes do mundo mostram que oomicetos da ordem Saprolegniales estão entre os principais patógenos da truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss* Walbaum), espécie aqui estudada, com ocorrência evidenciada principalmente nos ovos (Alvarez *et al.* 1988, Carballo *et al.* 1992, Oidtmann *et al.* 2008, Fadaeifard *et al.* 2011, Firooz *et al.* 2011, Vegas-Ramirez *et al.* 2013, Sandoval-Sierra *et al.* 2014a, Czczuga *et al.* 2015b, Thoen *et al.* 2016, Shin *et al.* 2017, López 2018, do Nascimento *et al.* 2020). A saprolegniose, doença causada por espécies do gênero *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota), é uma das mais importantes infecções, estando presente em todas as fases do ciclo de vida dos peixes (Krishna *et al.* 1990, Noga 1996, 2010, Ranzani-Paiva 1997, Hussein & Hatai 2002, Tavares-Dias *et al.* 2002, Read *et al.* 2007, van den Berg *et al.* 2013, Kiziewicz *et*

al. 2013, Shin *et al.* 2017, Magray *et al.* 2019, Raputean *et al.* 2019, González-Palacio *et al.* 2020). De acordo com estudos realizados em pisciculturas pelo mundo, a proliferação é reportada com maior frequência em água doce, na estação fria, ocorrendo normalmente em ambientes eutrofizados (Willoughby 2003, Bly *et al.* 1996, Czczuga *et al.* 2015a, b, Mastan & Ahmad 2018, Raputean *et al.* 2019). A doença é caracterizada por manchas brancas e acinzentadas em regiões cutâneas do hospedeiro, como um resultado do crescimento micelial (Noga *et al.* 1988, Ranzani-Paiva 1997, Torto-Alalibo *et al.* 2005, van West 2006, Read *et al.* 2007, Ke *et al.* 2009, Kiziewicz *et al.* 2013, Rezinciuc *et al.* 2014, Sarowar *et al.* 2014, Mastan 2015, Zaki & Fawazi 2015, Raputean *et al.* 2019), sendo responsável pela mortalidade em massa de peixes cultivados, como também de peixes selvagens em todo o mundo (Read *et al.* 2007, Robertson *et al.* 2009, Das *et al.* 2012, Sarowar *et al.* 2014, El-Hakin *et al.* 2019). Embora seja comum o registro de espécies de *Saprolegnia*, infecções em peixes causadas por oomicetos não se restringem apenas a este gênero, mas também a outros da mesma ordem, tais como *Achlya*, *Aphanomyces*, *Branchiomyces* e *Dictyuchus*, que muitas vezes não são identificados de forma correta e assim erroneamente relacionados à saprolegniose (Lilley *et al.* 1997, Dick 2001, Willoughby 2003, Pradhan *et al.* 2008, Diéguez-Uribeondo *et al.* 2009, Afzali *et al.* 2013, 2015, Hussein *et al.* 2013, Vegas-Ramirez *et al.* 2013, Chauhan 2014, Czczuga *et al.* 2015b, Lau *et al.* 2018, Mahboub & Shaheen 2021).

O controle da saprolegniose tem sido um dos principais objetivos dos piscicultores e seu tratamento e prevenção é foco de vários estudos (Fregeneda-Grandes *et al.* 2001, Gieseke *et al.* 2006, Read *et al.* 2007, Zaki *et al.* 2008, Corrêa *et al.* 2013, Zahran & Risha 2013, Belmonte *et al.* 2014, Ajagbe *et al.* 2018, Good *et al.* 2020). Devido às características morfológicas de reprodução, como a presença de zoósporos

biflagelados que nadam e tem rápida dispersão, a doença pode se disseminar com facilidade, infectando assim também peixes saudáveis (Fregeneda-Grandes *et al.* 2007, Walker & van West 2007, Gleason & Lilje 2009). Até 2006, a saprolegniose na aquicultura foi controlada com o uso de um corante orgânico, conhecido como verde de malaquita, no entanto, a utilização deste produto foi proibida em todo o mundo, devido aos seus efeitos cancerígenos e toxicológicos (Alderman 1994, Culp & Beland 1996). Efeitos benéficos têm sido apontados com o uso de permanganato de potássio em espécies de tilápia do Nilo – *Oreochromis niloticus* Lineu (Zahran & Risha 2013). Em cultivo de truta arco-íris, o formol, o permanganato de hidrogênio, o cloreto de sódio e o bronopol (princípio ativo do Pyceze®) apresentaram eficiência na prevenção de saprolegniose e tem sido utilizado em truticulturas ao redor do mundo (Scheirer *et al.* 1995, Giesecker *et al.* 2006, Oono & Hatai 2007, Oono *et al.* 2007, Corrêa *et al.* 2013, Rezinciuc *et al.* 2014, Ferreira *et al.* 2021).

1.3. Registro das espécies do filo Oomycota no Brasil

Diversos estudos realizados com oomicetos no Brasil mostraram a grande diversidade de espécies presente no país, incluindo recentes espécies novas dentro dos gêneros *Achlya*, *Halophthothora*, *Phytophthora* e *Saprolegnia* (Jesus *et al.* 2015, 2019, Li *et al.* 2016, Rocha *et al.* 2016a). A maioria desses estudos foi realizada em áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo (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, 2015, 2016, Rocha *et*

al. 2016a, b, Rocha *et al.* 2018b, Pires-Zottarelli *et al.* 2019, dentre outros), com alguns registros para o Cerrado e Caatinga (Rocha 2002, Baptista *et al.* 2004, Milanez *et al.* 2007, Macedo & Rocha 2017, Santos & Rocha 2017, Trindade & Rocha 2018, Machado & Rocha 2019, Saraiva & Rocha 2019).

Em sua maioria, tais estudos de diversidade no Brasil foram conduzidos em amostras de água, solo, gravetos e folhas e, desta forma, reportam geralmente oomicetos sapróbios. Embora exista significativa diversidade destes organismos no país, o número de espécies conhecidas gira em torno de 215 (Pires-Zottarelli, comunicação pessoal), o que é ainda baixo se considerado o tamanho territorial do país, bem como o número de espécies já conhecidas no mundo, estimada em torno de 1.500 espécies (Beakes & Thines 2017). Em cultivos de peixes, apesar de ainda existirem poucos registros no Brasil, é evidenciada a presença de algumas espécies de oomicetos (Costa *et al.* 2010, Bruno *et al.* 2011, Rocha *et al.* 2011, Pinheiro *et al.* 2015, Saraiva 2016, Rocha & Soares 2017, Carraschi *et al.* 2018).

Doenças como saprolegniose e também branquimicose (esta última causada por espécies do gênero *Branchiomyces*, ordem Saprolegniales) foram relatadas no país para diferentes espécies de peixes (Paperna & Di Cave 2001, Tavares-Dias *et al.* 2002, Ministério da Pesca e aquicultura 2012, Rocha & Soares 2017, Carraschi *et al.* 2018). Como exemplo, recentemente uma espécie do gênero *Aphanomyces* foi registrada em ovos de peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) cultivados em tanques do Instituto de Pesca em São Paulo (Ferreira *et al.* 2021), bem como *Saprolegnia aenigmatica* e *Pythiopsis cymosa* em espécies de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg) e em peixe ornamental (*Gasteropelecus sternicla* Lineu) analisados, respectivamente (Rocha & Soares 2017, Carraschi *et al.* 2018).

1.4. O cultivo da truta arco-íris no Brasil

A espécie truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) é da família Salmonidae (Ordem Salmoniformes, Filo Chordata), a qual é nativa da América do Norte, estando atualmente disseminada por todo o mundo. Considerada de fácil cultivo, a espécie apresenta produção intensiva em diversos países, principalmente na União Europeia, Noruega, Chile, Turquia e Irã (Adeli & Baghaei 2013). Apreciada por sua carne nobre, a produção comercial da truta vem crescendo exponencialmente desde a década de 50, o que confere a espécie grande importância em termos econômicos (Forshell 2002, Tabata & Portz 2004, Gil 2018). O ciclo reprodutivo completo da truta ocorre em dois anos, com as desovas se concentrando no inverno, onde os dias são mais curtos e as águas mais frias. Como todo salmonídeo, quando em ambiente natural, a espécie é denominada eurialina, por ter parte de seu ciclo biológico desenvolvido em água doce e parte em água salgada, no entanto, é comum o cultivo da truta somente em água doce, com a reprodução ocorrendo de forma artificial, a qual passa pelos estágios de ovos, larvas, alevinos, juvenis e adultos (Amaral 2007, Zárate *et al.* 2018, Arismendi *et al.* 2019).

No Brasil, o clima tropical restringe o cultivo da truta em regiões montanhosas, a qual foi introduzida na década 40 de forma experimental e com a intenção de fornecer alimento alternativo para as populações ribeirinhas, estando hoje presente na região da Serra da Mantiqueira em São Paulo, bem como regiões serranas de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio de Janeiro (Tabata & Portz 2004, Lazarotto & Caramaschi 2009). Embora o cultivo deste peixe seja normalmente realizado por produtores familiares no país, é considerado um empreendimento bem sucedido, permitindo a produção anual de 200 toneladas de truta arco-íris (Amaral 2007, Barone *et al.* 2017, Barbosa *et al.* 2020). O emprego do peixe no país inclui a utilização em pesqueiros, na prática recreativa, por

ser considerado facilmente domesticado, e também para alimentação, tanto a carne como seus ovos, como uma excelente fonte de proteína (Tabata & Portz 2004, Arismendi *et al.* 2019).

Embora o processo de cultivo da truta tenha encontrado condições favoráveis em regiões montanhosas do país, impactos ambientais são inevitáveis, tais como as interações tróficas pelo aumento da matéria orgânica (Skoronski *et al.* 2018, Tahar *et al.* 2018, Barbosa *et al.* 2020). Assim, é reconhecido que este processo interfere na ecologia do ambiente pela modificação do habitat com a inserção do cultivo intensivo e do manejo, bem como a introdução de espécies exóticas e patógenas no ambiente (Gowen *et al.* 1990, Naylor *et al.* 2000, Lacerda *et al.* 2013, Moraes *et al.* 2016, López 2018, Henrique *et al.* 2020). Embora não haja conhecimento no Brasil, é relatado que os oomicetos estão entre os principais patógenos da truta arco-íris (do Nascimento *et al.* 2020), os quais ocorrem principalmente nos ovos (Alvarez *et al.* 1988, Carballo *et al.* 1992, Oidtmann *et al.* 2008, Fadaeifard *et al.* 2011, Firooz *et al.* 2011, Vegas-Ramirez *et al.* 2013, Sandoval-Sierra *et al.* 2014a, Czczuga *et al.* 2015b, Thoen *et al.* 2016, Shin *et al.* 2017, López 2018).

Considerando o ainda escasso conhecimento das espécies de oomicetos em ambientes aquáticos utilizados para piscicultura no Brasil, da problemática presença de oomicetos em ovos de truta arco-íris, somado à ausência de estudos realizados com oomicetos em áreas de truticulturas no país, o presente estudo visou avaliar a riqueza e a diversidade de representantes do filo Oomycota, presentes em duas truticulturas selecionadas para estudo, bem como nas diferentes fases de desenvolvimento do peixe, possibilitando a detecção dos pontos de entrada dos eventuais patógenos nos sistemas estudados.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Identificação, com base em estudos morfológicos e moleculares (regiões ITS, LSU e/ou SSU do rDNA), de representantes do filo Oomycota coletados em amostras de água, de peixes sintomáticos e/ou mortos, bem como de ovos, nas duas truticulturas selecionadas para estudo;

(ii) Contribuição para o conhecimento sobre a ocorrência de espécies do filo Oomycota em pisciculturas no Brasil;

(iii) Investigação do momento em que as espécies de oomicetos entram nos sistemas de cultivo de truta estudados, bem como análise da ocorrência destes organismos nos peixes e seus ovos;

(iv) Ampliação do acervo da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) por meio da inclusão de espécimes do filo Oomycota, bem como incremento ao banco de dados do GenBank, com disponibilização das sequências gênicas obtidas;

(v) Construção de análises filogenéticas.

3. HIPÓTESES

(i) A maioria das espécies do filo Oomycota presentes nas truticulturas estudadas pertence à ordem Saprolegniales;

(ii) A ocorrência dos oomicetos nas truticulturas estudadas é maior durante a época de reprodução do peixe, que ocorre em épocas mais frias do ano no país, devido à maior oferta de substrato (ovo) a ser colonizado;

(iii) Espécies de oomicetos estão presentes nos sistemas de cultivo da truta arco-íris, mesmo que não haja peixes sintomáticos, sendo o gênero *Saprolegnia* o mais frequente;

(iv) Novos registros e/ou espécies novas do Filo Oomycota são encontradas em um ambiente pouco explorado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Áreas de estudo

Duas importantes truticulturas foram selecionadas para estudo dentro da cidade de Campos do Jordão (24°44'10"S e 45°34'34"O), localizada no estado de São Paulo (**figura 1**). A cidade, com clima típico montanhoso, justificado por uma altitude média de 1.500 metros acima do nível do mar, e temperaturas médias inferiores a 20°C, é considerada lugar perfeito para o cultivo de trutas, o qual necessita de águas frias e bem oxigenadas (Sato *et al.* 2011, Guimarães 2014, Barbosa *et al.* 2020). As truticulturas selecionadas para estudo, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) e Unidade Particular (UP), são caracterizadas a seguir.

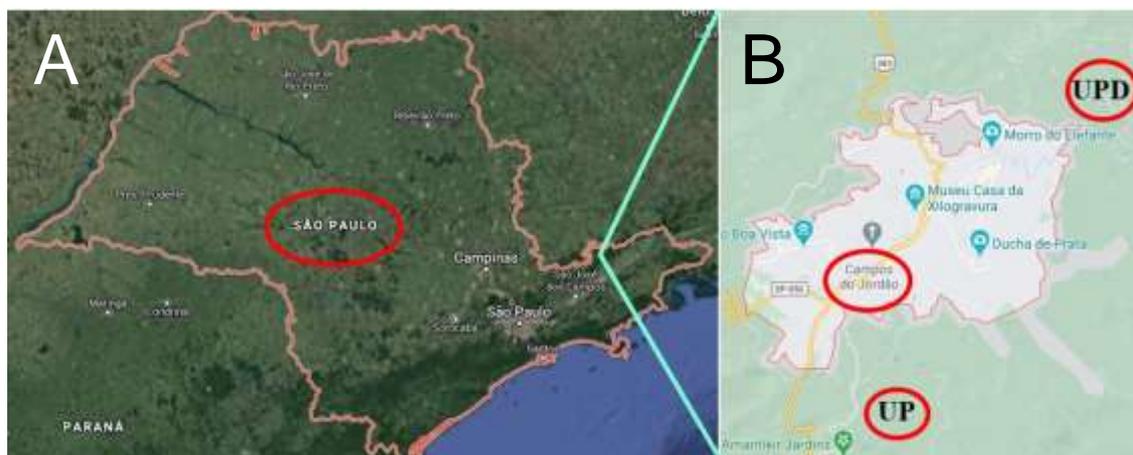


Figura 1. A – Estado de São Paulo. B – Cidade de Campos do Jordão e a localização das duas truticulturas (UPD: Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento e UP: Unidade Particular) selecionadas para o estudo. Fonte: Google maps

4.2. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD)

A estação experimental de salmonicultura é uma Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA) pertencente à Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

(**figuras 2 e 3**). A estação está localizada dentro do Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ), em uma área de dois hectares, compreendendo um laboratório para incubação e alevinagem, um centro de treinamento e 50 tanques para cultivo do peixe (APTA 2014). O abastecimento de água para o laboratório é proveniente de uma nascente existente no parque, sendo o Córrego Galharada o responsável pelo abastecimento dos tanques, em uma região a 1.500 metros de altitude (Guimarães 2014).



Figura 2. Tanques de cultivo de truta arco-íris na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) dentro do Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ). Ao fundo, o laboratório de incubação dos ovos e alevinos. Foto: Sarah C.O. da Paixão

As diferentes atividades realizadas na UPD visam à difusão de tecnologias para a melhoria da qualidade do cultivo de truta arco-íris no Brasil (Tabata *et al.* 1999, Tabata & Portz 2004, Sato *et al.* 2011, APTA 2014, Machado *et al.* 2016, Gomes *et al.* 2020, Torres & Mancilha 2020). A fecundação é induzida de forma artificial e modificações genéticas são estudadas e aplicadas para facilitar o manejo e a comercialização desse peixe no país. No período da desova, os peixes são sedados para a retirada de material biológico e utilizados na fertilização artificial. Toda a

manipulação é feita no laboratório da unidade, bem como o cultivo dos ovos, os quais são comercializados e cultivados para criação de novos genitores (Tabata & Portz 2004, Sato *et al.* 2011, Machado *et al.* 2016). Ao longo do desenvolvimento dos peixes, alguns fatores abióticos da água, tais como nível de oxigênio, temperatura e pH, são monitorados, a fim de manter a sua qualidade e o crescimento saudável dos peixes.

4.3. Unidade particular (UP)

A Unidade Particular (UP) de cultivo de truta tem por finalidade a reprodução e engorda que culminam no consumo nutricional e recreativo do peixe. Está localizada próxima ao centro comercial da cidade de Campos do Jordão (22°46'56.6"S e 45°36'05.5"W), em uma altitude de 1.680 metros. A área compreende um laboratório para incubação e alevinagem, o qual recebe água de nascente, bem como 16 tanques para cultivo da truta em diferentes fases de desenvolvimento, o qual é abastecido por águas do Ribeirão Lajeado. Nessa truticultura, a água que sai de ambos os sistemas (tanques e laboratório) deságuam em um lago utilizado para a promoção da pesca esportiva de trutas e outros peixes (**figuras 4 e 5**). A propriedade também possui restaurante e venda comercial do peixe para consumo.

4.4. Coletas nas truticulturas estudadas

4.4.1. Periodicidade das coletas nas truticulturas estudadas

Considerando o ciclo reprodutivo da truta arco-íris, quatro coletas foram realizadas, nas duas truticulturas selecionadas para estudo, compreendendo o período de um ano (agosto/novembro de 2016 e março/junho de 2017).

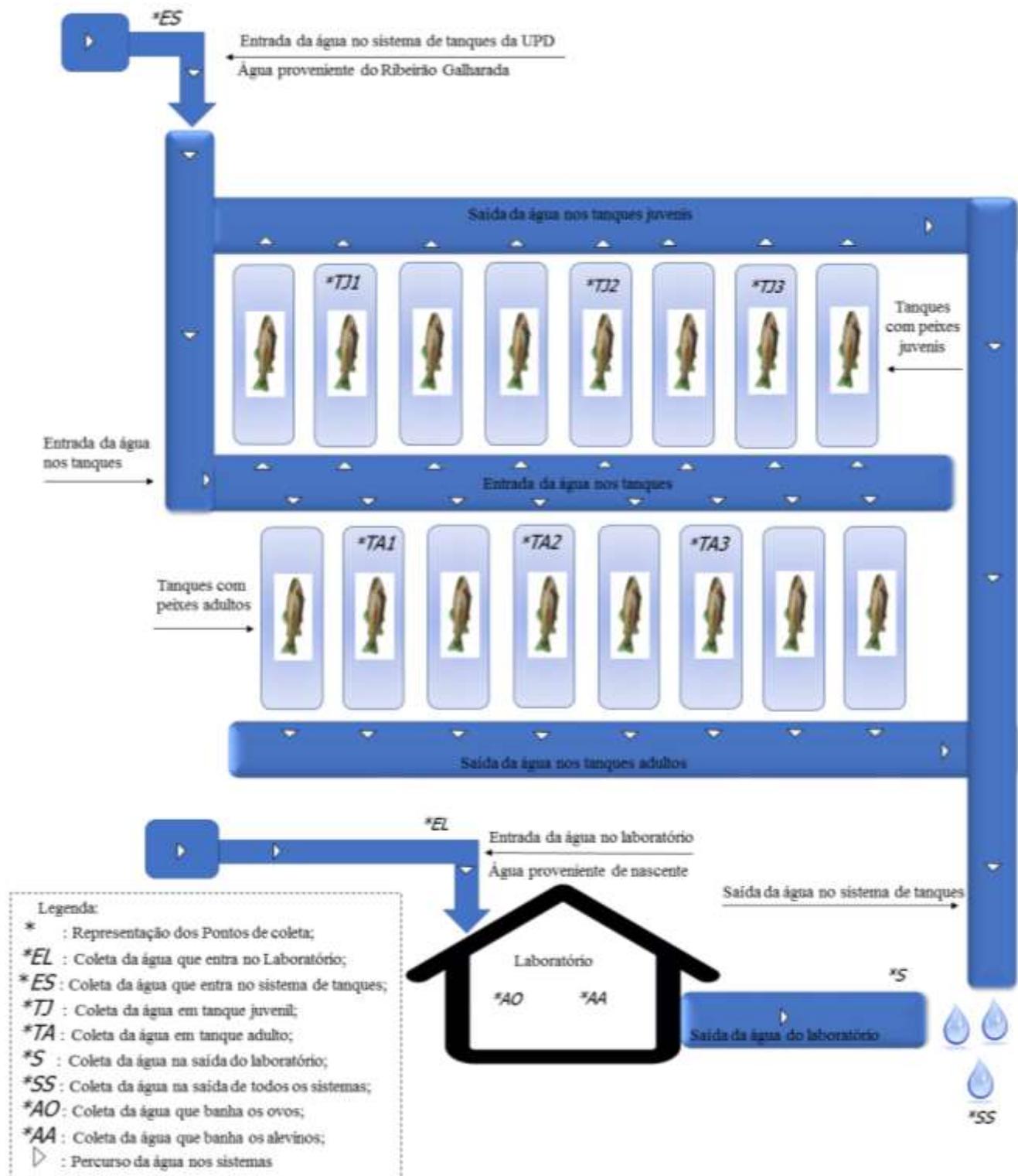


Figura 3. Esquema simplificado do sistema de criação de truta na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD). *: Indica os pontos de amostragem. ES: Entrada de água no sistema de tanques proveniente do Ribeirão Galharada; EL: Entrada da água ao laboratório, proveniente da nascente, onde são cultivados ovos e alevinos; TJ: Tanques de Peixes Juvenis; TA: Tanques de Peixes Adultos; AO: Água que banha os ovos; AA: Água que banha os alevinos; S: Saída de água do laboratório; SS: Saída de água de todo o sistema (nascente +Ribeirão Galharada).



Figura 4. Tanques de cultivo da truta arco-íris na Unidade Particular (UP) na cidade de Campos do Jordão. Fonte: Ph7 Filmagens Aéreas

4.4.2. Coleta na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD)

No laboratório foram coletadas amostras de água que banhava os alevinos (AA) e os ovos (AO), bem como coletados ovos com aparente colonização por oomicetos, quando existentes. Em campo, foram coletadas amostras de água em três tanques com peixes juvenis (TJ1, TJ2 e TJ3) e adultos (TA1, TA2 e TA3), das entradas do sistema de tanques (ES) e do laboratório (EL), bem como da saída do laboratório (S) e de todo o sistema (SS) (**figuras 3 e 6**). Peixes sintomáticos e/ou mortos foram coletados, quando existentes.

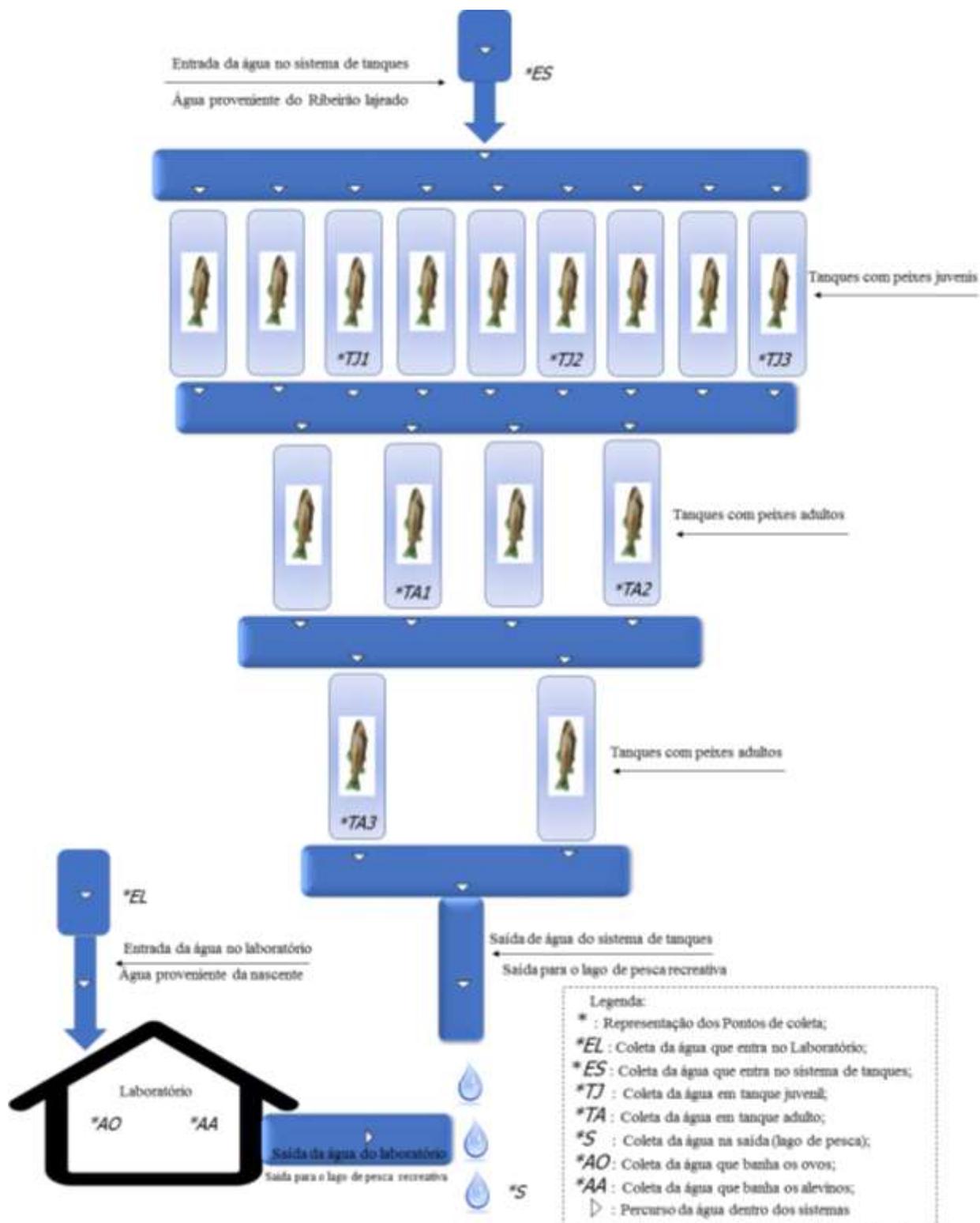


Figura 5. Esquema simplificado do sistema de criação de truta na Unidade Particular (UP). *: Indica os pontos de coleta da água. ES: Entrada da água nos sistemas de tanques proveniente do Ribeirão Lajeado; EL: Entrada da água ao laboratório, proveniente da nascente, onde são cultivados ovos e alevinos; TJ: Tanques de Peixes Juvenis; TA: Tanques de Peixes Adultos; AO: Água que banha os ovos; AA: Água que banha os alevinos; S: Saída de água do sistema (lago de pesca recreativa)

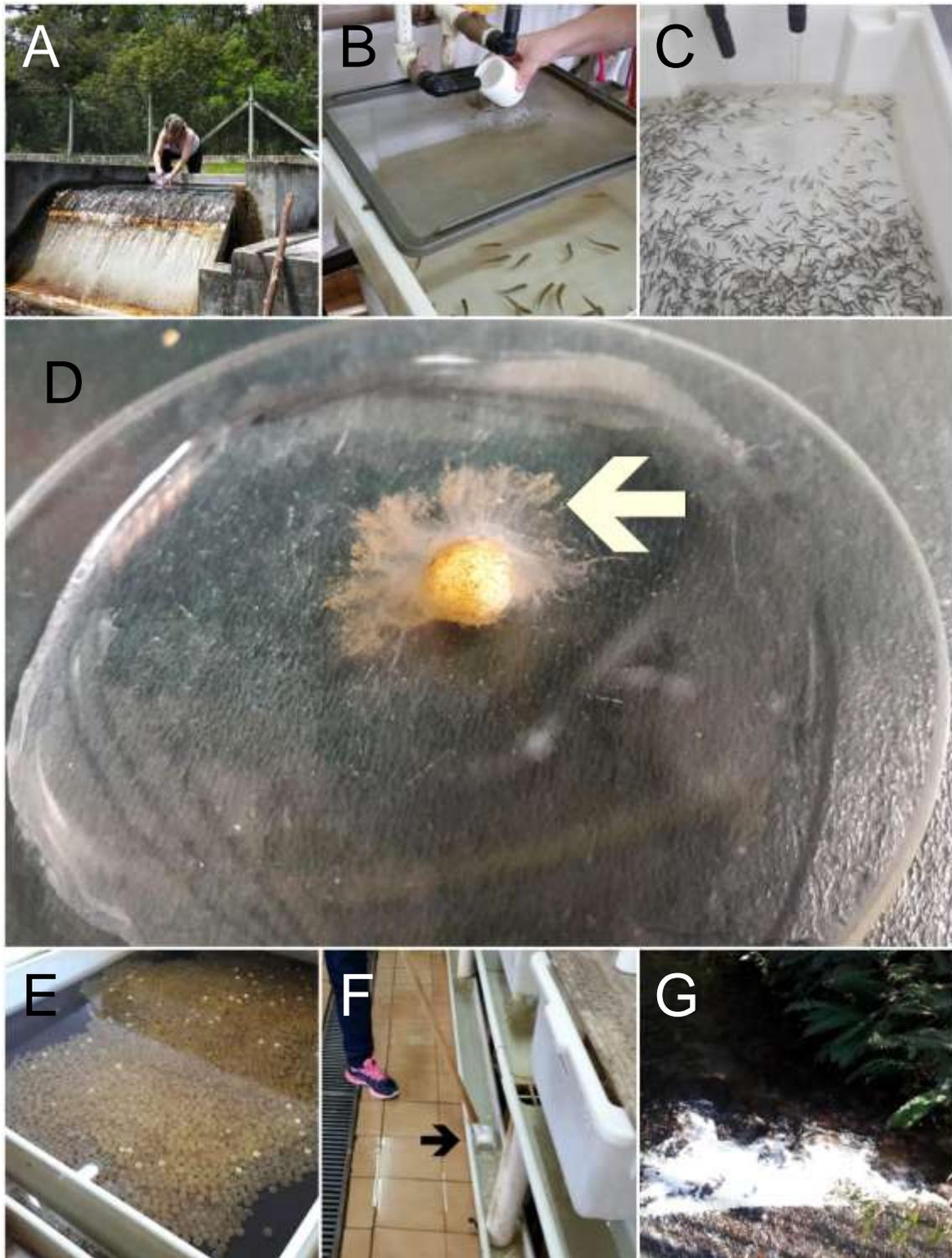


Figura 6. Amostragem na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD). **A** – Coleta de amostra de água na entrada do sistema. **B** – Coleta de amostra de água que entra no laboratório. **C** – Cultivo de alevinos. **D** – Ovo colonizado por oomiceto (seta indica crescimento do micélio). **E** – Água que banha os ovos. **F** – Coleta de água da saída do laboratório (seta indica local de saída da água). **G** – Água da saída de todo o sistema. Fotos: Sarah C.O. da Paixão

4.4.3. Coleta na Unidade Particular (UP)

No laboratório foram coletadas amostras de água que banhava os alevinos (AA) e os ovos (AO), bem como coletados ovos com aparente colonização por oomicetos, quando existentes. Em campo, foram coletadas amostras de água em três tanques com peixes juvenis (TJ1, TJ2 e TJ3) e adultos (TA1, TA2 e TA3), e das entradas do sistema de tanques (ES) e do laboratório (EL). Para esta unidade, uma única saída de água foi considerada para ambos os sistemas (tanques e laboratório), consistindo em um lago de pesca recreativa (SS), onde foram coletadas amostras de água (**figuras 5 e 7**). Peixes sintomáticos e/ou mortos foram coletados, quando existentes.

4.5. Procedimento das coletas, processamento das amostras e identificação morfológica dos espécimes de oomicetos coletados nas truticulturas estudadas

Para as duas truticulturas, as amostras de água e ovos colonizados por oomicetos foram colocados em potes plásticos com vedação (300 mL), com os ovos transportados imersos em água destilada e esterilizada. Peixes sintomáticos e/ou mortos foram inseridos em sacos plásticos com vedação, sem água. Todas as amostras de água foram coletadas em triplicatas, na intenção de aumentar o esforço amostral e obter o maior número de espécimes, sendo transportadas em caixas térmicas. Em laboratório, as amostras de água foram colocadas em placas de Petri (30 mL da amostra) e submetidas à técnica de iscagem múltipla, com uso de substratos (queratinoso e celulósico), sendo utilizadas em cada placa duas sementes de *Sorghum* sp. cortadas ao meio, previamente fervidas para perder o poder de germinação, e dois discos de 0,6 cm de ecdise de cobra, epiderme de cebola e de palha de milho (**figura 8**), conforme metodologia descrita em Milanez (1989). Posteriormente, as amostras foram mantidas em sala com temperatura ambiente (~22°C) e as iscas analisadas a partir do sétimo dia de incubação.

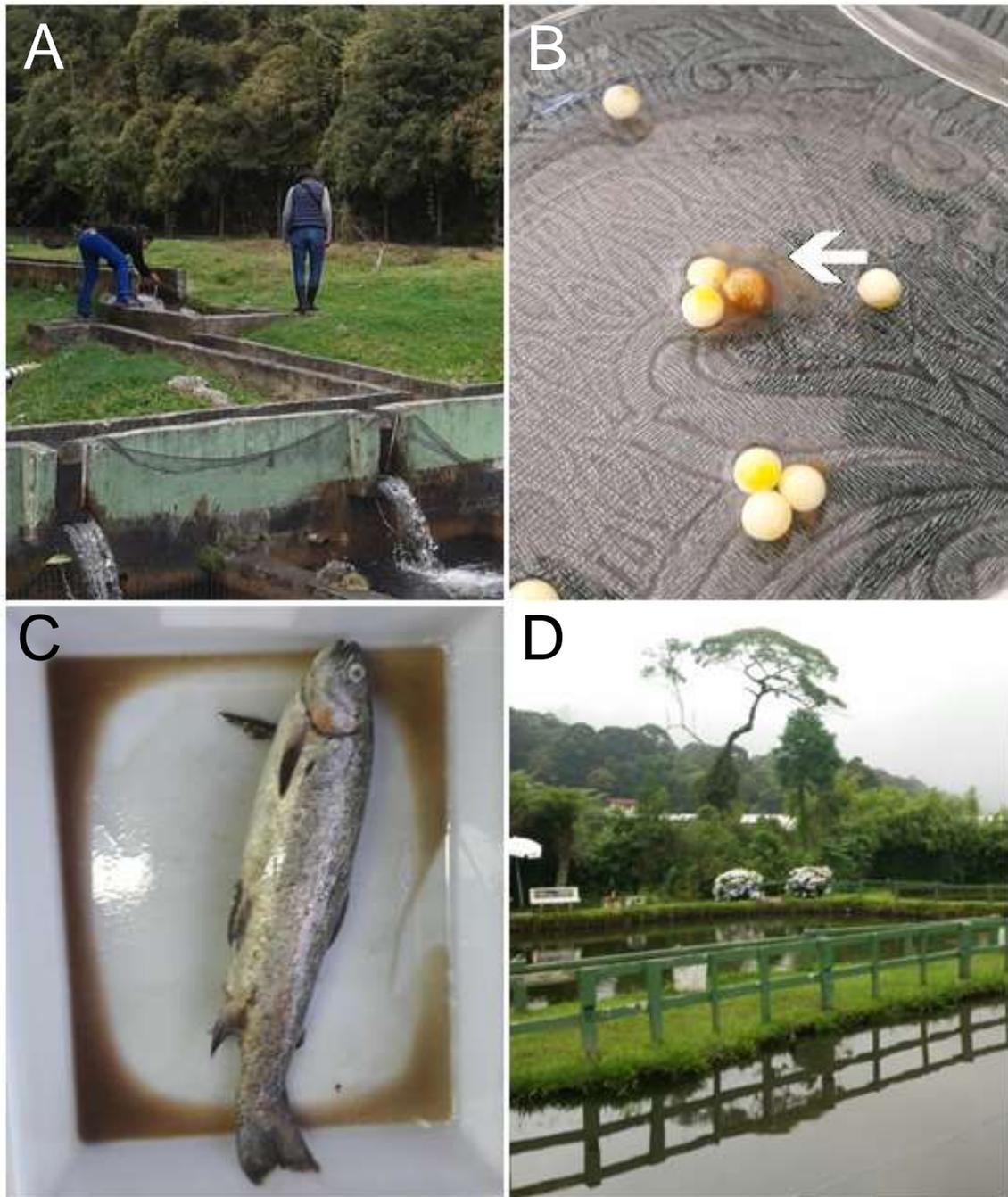


Figura 7. Amostragem na Unidade Particular (UP). **A** – Coleta de amostra de água na entrada do sistema. **B** – Ovo colonizado por oomiceto (seta indica crescimento do micélio). **C** – Peixe morto. **D**– Saída do sistema (lago de pesca). Fotos: Sarah C.O. da Paixão

Os peixes sintomáticos e/ou mortos foram analisados logo na chegada ao laboratório, onde se procederam a raspagem da epiderme do animal, preparação de lâminas com água destilada esterilizada e lamínulas, e observação sob microscópio

óptico. Micélios presentes nos ovos coletados foram analisados no dia seguinte. Os ovos foram mantidos incubados por uma semana e novamente examinados antes do descarte.

Após identificação morfológica dos oomicetos presentes nas iscas, em peixes sintomáticos e/ou mortos e ovos, esses foram purificados em meios de cultura específicos. Os meios de cultura utilizados foram MP₅ (2g maltose, 0,5g de peptona e 7,5g ágar para 500mL de água destilada esterilizada) para representantes de Saprolegniales, e CMA (8,5g de “cornmeal” ágar e 500mL de água destilada esterilizada) para Peronosporales, todos acrescidos de 1g de penicilina, 0,5g de sulfato de estreptomicina e 0,05g de vancomicina (Sparrow 1960, Fuller & Jaworski 1987, Nascimento *et al.* 2011, Marano *et al.* 2014, Jesus *et al.* 2015, Gonçalves *et al.* 2016, Lau *et al.* 2018, Lone & Manohar 2018).

Após purificação, os espécimes foram inicialmente identificados morfológicamente em nível de gênero e/ou espécie, quando possível, com uso de literatura específica, tais como Sparrow (1960), Plaats-Niterink (1981) e Johnson *et al.* (2002). O sistema de classificação adotado foi o de Beakes *et al.* (2014), modificado.

4.6. Análises moleculares

4.6.1. Produção de biomassa dos oomicetos para extração de DNA

Após purificação e triagem morfológica inicial, os espécimes de oomicetos foram selecionados para a produção de biomassa e posterior extração do DNA. O critério de seleção para a extração de DNA seguiu, em princípio, as seguintes prioridades: a) representantes identificados em nível específico, normalmente mais de um selecionado, conforme necessidade da obtenção de dados moleculares; b) espécimes apresentando estruturas de reprodução assexuada e sexuada, mas não identificados em nível específico; c) seguindo a prioridade b, ocorrendo em diferentes truticulturas e

locais de amostragem; d) Espécimes apresentando apenas estruturas de reprodução assexuada, cuja triagem morfológica evidenciou características incomum e/ou gêneros com poucos dados moleculares e seguindo a prioridade c.

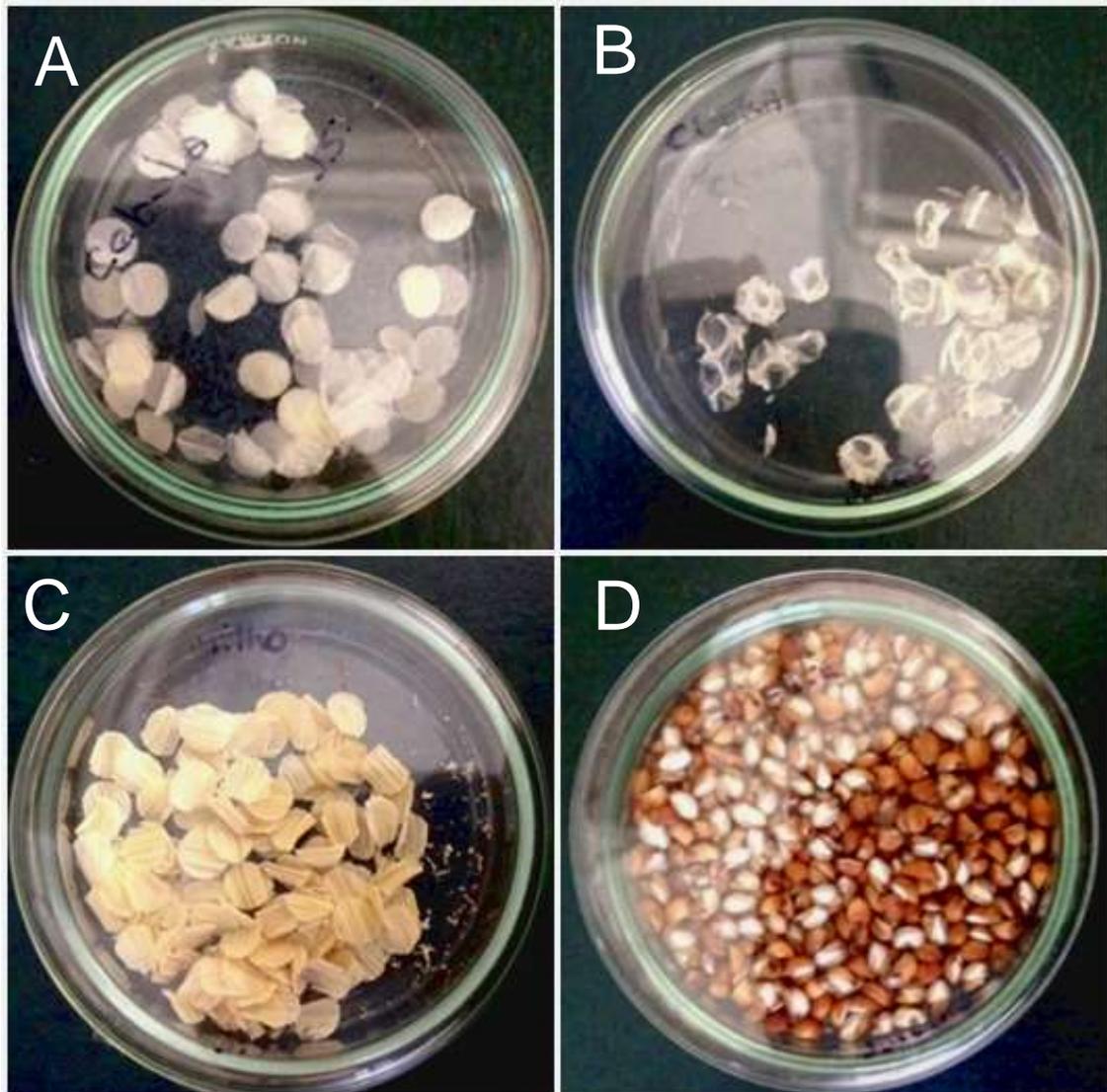


Figura 8. Substratos para iscagem: **A** – Discos de epiderme de cebola. **B** – Discos de ecdise de cobra. **C** – Discos de palha de milho. **D** – Sementes de *Sorghum* sp. cortadas ao meio. Fotos: Ana L. de Jesus

Para a extração de DNA dos espécimes foram retirados pequenos fragmentos de micélio a partir de culturas crescidas em meio de cultura sólido, para a inoculação em tubos falcon (50mL) ou erlemeyers de 100mL contendo 20mL de meio de cultura líquido MP5. Os tubos foram incubados em modo estacionário por 3–5 dias em

temperatura de ~22°C. Após crescimento, os fragmentos de biomassa foram retirados com uma pipeta automática, transferidos para microtubos eppendorf (1,5–2,0mL) e então centrifugados a 13000rpm 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 1mL de água ultrafiltrada e esterilizada. Os microtubos com biomassa dos espécimes foram agitados em vortex a ~2000rpm durante 20–30 segundos e novamente centrifugados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a biomassa utilizada para extração de DNA.

4.6.2. Extração, amplificação e purificação do DNA

A extração e a purificação do DNA genômico dos espécimes foram realizados com kit de extração “PureLinkGenomic DNA Kit” (Invitrogen™). Durante a etapa inicial, indicada para a lise de células e tecidos, foram adicionados 180µL de tampão de digestão e 20µL de proteinase K aos microtubos contendo os péletes de biomassa. O material de cada microtubo foi agitado em vortex a ~2000rpm por 15 segundos, macerado com pistilo (PES-15-B-SI, Axygen®) por cerca de 10-15 minutos, e colocado 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 60µL 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 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.

Foram amplificadas por PCR as regiões ITS total (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA com os primers UN-up18S42 e UN-1°28S22 (Robideau *et al.* 2011), LSU do rDNA com os “primers” LR0R e LR6-O (Riethmüller *et al.* 2002) e/ou SSU do rDNA com os primers NS4 e SR1R (White *et al.* 1990). As reações 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 25µL em microtubos de 200µL, sendo 22,5µL de “PCR Supermix”, 0,75µL de cada primer na concentração de 10µM e 1–2µL 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 meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) submerso em tampão TBE 1x, aplicando-se 2µL de padrão “123pb DNA Ladder” (Invitrogen™) + 2µL de “Gel Loadingsolution, Type I, 6x” (Sigma®) no primeiro poço e 2µL de DNA + 2µL de “Gel Loading” nos poços seguintes. O gel de agarose (75mL) foi aquecido em micro-ondas e resfriado em água corrente, sendo previamente corado com 3,5µL de “GelRed™ NucleicAcid 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 100V durante 40 minutos. Os géis de agarose foram visualizados em um transiluminador UV (Kasvi). O material amplificado foi armazenado em geladeira (5–8°C).

O material amplificado foi purificado manualmente de acordo com a descrição em Schmitz & Riesner (2006), que consisti na inserção em microtubos de 1,5mL, a mistura de 1,6µL de EDTA 0,5M, 21µL de PEG a 50% e 8,1µL de NaCl5M. O produto da PCR foi adicionado à mistura (120µL) e incubado por 10 minutos. Em seguida, foi

centrifugado por 10 minutos a 13000rpm e o sobrenadante descartado. Após, adicionou-se 125µL de etanol 70%, centrifugou-se por 5 minutos a 13000rpm e descartou-se o sobrenadante. Após esta etapa os tubos foram colocados em termoblocos para secar a 36°C por 25 minutos. Por fim, adicionou-se 30µL de água osmose reversa para suspender o DNA.

4.6.3. Sequenciamento das amostras

As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen®, na Coréia do Sul. As sequências obtidas foram editadas manualmente utilizando-se o programa “Sequencher™ Version 4.1.4”, para a realização dos cortes de suas extremidades, montagem dos “contigs”, correção de bases ambíguas de acordo com os cromatogramas e obtenção das sequências consenso. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta de busca “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn).

4.7. Tratamento das sequências obtidas e análises filogenéticas

As sequências obtidas foram incluídas em fastas com sequências disponíveis no GenBank para as análises filogenéticas. O alinhamento foi realizado online (<http://www.phylo.org/>) pela ferramenta MAFFT v. 7.058 (Kato *et al.* 2017). A correção do alinhamento e eliminação de regiões ambíguas foram feitas no programa Geneious (v. 8.0.5) e/ou Bioedit (Hall 1999). Quando necessário, a escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica foi realizada no programa JModelTest 0.1.1 (Posada 2008, Darriba *et al.* 2012). As análises filogenéticas pelo método de máxima

verossimilhança e bayesiana foram construídas usando RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) e MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) na plataforma CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>).

4.8. Análise da comunidade dos oomicetos presentes nas diferentes amostras das truticulturas estudadas

Os táxons foram considerados presentes em cada unidade amostral quando registrados durante a incubação nas iscas e/ou nas amostras observadas. A frequência e a abundância das espécies foram calculadas com base na presença e ausência dos táxons (Marano & Steciow 2006, Nascimento *et al.* 2011): Frequência (F%) - calculada considerando a presença do táxon/número de amostras $\times 100$; Abundância (A) - somatória do número de táxons registrados nas amostras.

A estrutura da comunidade foi analisada mediante o cálculo de: (i) riqueza de espécies (S); (ii) índice de diversidade de Shannon $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2(p_i)$, onde p_i é a abundância da espécie i , que contribui para a diversidade total; e (iii) equitabilidade $E = H'/H'_{\max}$, onde H'_{\max} é o máximo valor de diversidade possível para o total de espécies presentes (Magurran 1988); e (iv) índice de dominância de Simpson $D = 1/\sum_{i=1}^S (p_i)^2$. Para verificar a similaridade entre as duas truticulturas, considerando a ocorrência dos táxons de oomicetos, foi calculado o índice de Sørensen (SI) por meio da fórmula $SI = [2c/a + b] \times 100$, onde (c) representa o número de táxons comuns às duas truticulturas, (a) o número de táxons na UPD e (b) o número de táxons na UP (Müller-Dombois & Elleberg 1974). O teste de Wilcoxon foi utilizado para verificar a existência de diferenças no número de registros de espécies dentro das ordens representadas, bem como no período de estudo, em cada uma das truticulturas estudadas, considerando resultados estatisticamente significativos com valores de $p < 0,05$ (Hammer *et al.* 2001).

4.9. Variação da temperatura do ar nos meses de coleta

A temperatura do ar (°C) da cidade de Campos do Jordão, nos meses de coleta, foi obtida junto ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), por meio de medições diárias da temperatura realizada na estação climatológica A706.

4.10. Métodos de preservação dos espécimes identificados

Com a finalidade de preservar os espécimes, mantendo-os viáveis por um longo período, alguns representantes das espécies de oomicetos identificadas foram depositados na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) por meio de diferentes métodos de preservação (**figura 9A**). Todos os métodos de preservação foram feitos em triplicata, sendo mantidos em sala climatizada com temperatura em torno de 19°C. Dentre os representantes de oomicetos, para os quais não foi possível cultivo em meio de cultura, lâminas semipermanentes foram confeccionadas e incorporadas ao Herbário SP (**figura 9B**).

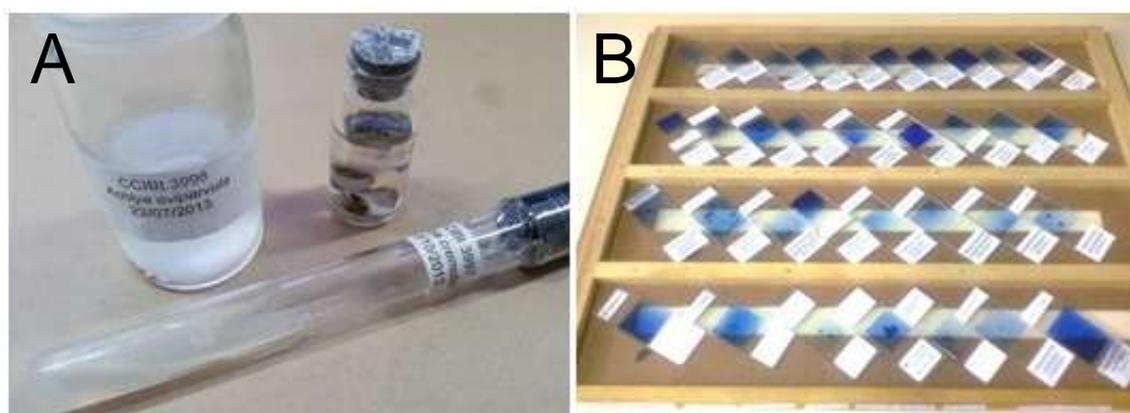


Figura 9. A – Métodos de preservação: Em frasco Wheaton com água destilada esterilizada e metades de sementes de *Sorghum* sp., em tubo inclinado com meio de cultura específico para cada grupo preservado e pelo método de Castellani. **B** – Lâminas semipermanentes. Fotos: Marcela C. Boro

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Variação da temperatura do ar (°C) nos meses de coleta

Os dados obtidos junto ao INPE mostraram que a temperatura do ar na cidade de Campos do Jordão, considerando os meses mais quentes e frios do período de coleta, apresentaram máximas de 24,5°C e 22,3°C, e mínimas de 11,3°C e 11,0°C, nos meses de novembro/2016 e março/2017; e máximas de 21,2°C e 17,3°C, e mínimas de 9,0°C e 5,7°C, nos meses de agosto/2016 e junho/2017, respectivamente (**figura 10**). Os resultados obtidos mostram ter a cidade temperaturas amenas durante todo o ano, o que é explicado por sua elevada altitude e baixa pressão atmosférica, sendo o clima da região classificado como subtropical, tipo Cfb, conforme o sistema de classificação de Köppen (Seibert *et al.* 1975, de Souza *et al.* 2012).

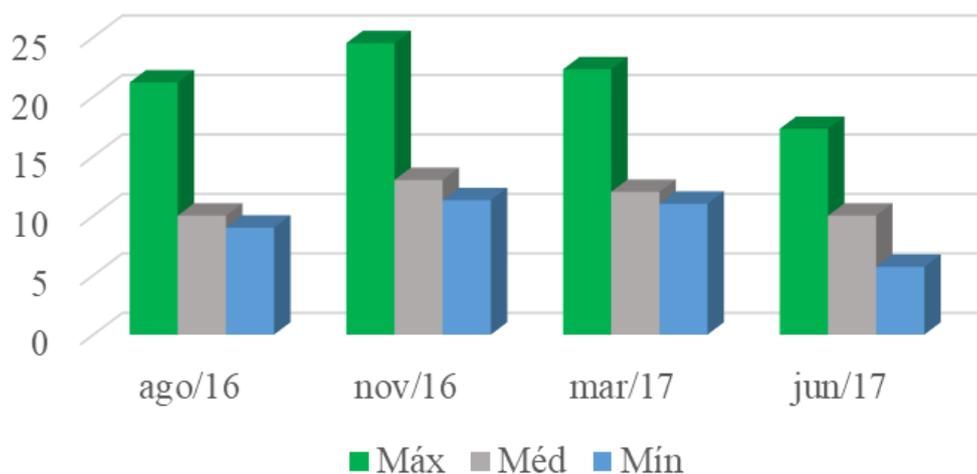


Figura 10. Temperaturas médias do ar (máximas, médias e mínimas) na cidade de Campos do Jordão (SP) nos meses de coleta.

5.2. Ocorrência dos oomicetos nas truticulturas estudadas

Um total de 535 espécimes de oomicetos foram registrados no presente estudo. Foram analisadas 276 amostras de água coletadas durante as quatro coletas, nas truticulturas estudadas, considerando as triplicatas, sendo identificados destas amostras 511 espécimes de oomicetos. Somente peixes mortos de truta arco-íris foram observados, os quais foram coletados na primeira, segunda e quarta coletas, nos tanques e no lago de pesca da Unidade Particular (UP). Destes, foram identificados 10 espécimes de oomicetos, os quais foram considerados presentes quando cresceram em meio de cultura e/ou na água, como resultado da raspagem da epiderme de cada peixe coletado. Ovos colonizados por oomicetos puderam ser coletados na primeira e quarta coletas na UP, e na primeira, segunda e quarta coletas na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD), com um total de 14 espécimes identificados, sendo considerados presentes os espécimes que se desenvolveram diretamente nos ovos, ou que estavam parasitando os oomicetos presentes nos ovos. Dos 535 espécimes registrados, um total de 283 espécimes foi obtido na UP, e 252 na UPD, os quais estão agrupados em suas respectivas ordens e gêneros na tabela 1.

De maneira geral, as duas truticulturas apresentaram similares resultados no que se refere à presença dos gêneros de oomicetos (**tabela 1**). Para facilitar a discussão dos resultados serão abordados os aspectos gerais das duas truticulturas (UP e UPD), contudo, os dados de cada unidade são apresentados separadamente, não tendo sido objetivo deste estudo a comparação das duas unidades, devido às características particulares de cada sistema de cultivo.

Tabela 1. Espécimes de oomicetos registrados nas duas truticulturas (**UPD:** Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento; **UP:** Unidade Particular) estudadas, agrupados em suas respectivas ordens e gêneros. **ES:** água que entra nos sistemas de tanques; **EL:** água que entra nos laboratórios; **TJ:** tanques com peixes juvenis; **TA:** tanques com peixes adultos; **AO:** água dos incubatórios dos ovos; **AA:** água dos incubatórios dos alevinos; **S:** água da saída dos tanques; **SS:** água da saída de todo o sistema; **F%:** frequência; **AB:** abundância

Unidade	Ordem	Gênero	ES	TJ1	TJ2	TJ3	TA1	TA2	TA3	S	EL	AO	AA	SS	Ovos	F%	AB			
UPD	Saprolegniales	<i>Achlya s.l.</i>	6	9	9	5	2	5	9	3	6	4	5	2	1	100	66			
		<i>Aphanomyces</i>	1	4	1	1	2	3	1	5	1		5	2	1	92	27			
		<i>Dictyuchus</i>		1	1	1	1	1	1	3	1	1			2	2	85	15		
		<i>Leptolegnia</i>							1							1	15	2		
		<i>Newbya</i>						1			1				4		23	6		
		<i>Plectospira</i>	6	3	1	4	6	4	4	4	3	4		2	3		85	40		
		<i>Saprolegnia</i>	1	1	6	2	4	3	5	6	6	2	7	2	3	3	100	45		
		<i>Thraustotheca</i>													2		15	3		
		Peronosporales s.l.	<i>Pythiogeton</i>		9				4	2		2						31	17	
				<i>Pythium</i>		4	1	2		1	2	6	2			5	2	58	25	
Olpidiopsidales s.l.	<i>Olpidiopsis</i>						1			1	1				2	38	6			
Total de espécimes			23	22	19	15	20	21	22	30	18	13	14	23	12		252			
Unidade	Ordem	Gênero	ES	TJ1	TJ2	TJ3	TA1	TA2	TA3	Peixes	EL	AO	AA	S	Ovos	F%	AB			
UP	Saprolegniales	<i>Achlya s.l.</i>	12	6	12	5	8	8	7	2	7	4	5	11	2	100	90			
		<i>Aphanomyces</i>			2			2				2	2	1	1		46	10		
		<i>Dictyuchus</i>	5	2	2			2	4				1				46	16		
		<i>Leptolegnia</i>									1				1		15	2		
		<i>Newbya</i>	2	2	2	1	1	3	2	1	2			2	2		85	20		
		<i>Plectospira</i>	5	6	4	5	5	5	3			2	2	2	3		85	42		
		<i>Saprolegnia</i>		6	3	3	3	3		3	3	2	5	3	8		77	39		
		Peronosporales s.l.	<i>Phytopythium</i>			2					2					2		23	6	
				<i>Pythiogeton</i>	5		2	1	1	1			1	3					54	14
				<i>Pythium</i>	7	4	2	5	4	3			2	6		1	8		77	41
Olpidiopsidales s.l.	<i>Olpidiopsis</i>	2									0			1		15	3			
Total de espécimes			38	26	31	20	22	24	21	10	24	14	14	37	2		283			
Total																	535			

Por meio dos estudos morfológicos e moleculares dos espécimes isolados nas duas truticulturas, três ordens do filo Oomycota foram representadas, com um gênero em Olpidiopsidales *s.l.*, três em Peronosporales *s.l.* e oito em Saprolegniales (**tabela 1**). Comparando o número de registros de oomicetos dentro das respectivas ordens, o número de espécimes em Saprolegniales foi significativamente maior, tanto na UPD, quanto na UP ($p < 0,05$). Este resultado está de acordo com a literatura existente, que relata a alta frequência de espécimes de Saprolegniales em diferentes pisciculturas (Czeczuga & Woronowicz 1993, Czeczuga *et al.* 2010, Hussein *et al.* 2013, Dubey *et al.* 2018), incluindo cultivos de salmonídeos (Mousavi *et al.* 2009, Czeczuga *et al.* 2011, 2015a, Fadaeifard *et al.* 2011, Sakaguchi *et al.* 2019).

Neste estudo, *Achlya s.l.* foi o gênero mais abundante, conforme evidencia o cálculo de abundância (UPD= 66 e UP= 90, **tabela 1**), com registro de espécimes nas duas unidades, e distribuídos em todos os locais amostrados, o que justifica a frequência de 100% em ambas as unidades. Este gênero é considerado como um dos mais importantes dentro de Saprolegniales, estando comumente presente em diversas espécies de peixes e seus ovos ao redor do mundo (Willoughby 1970, Czeczuga & Woronowicz 1993, Willoughby 1997, Fregeneda-Grandes *et al.* 2007, Mousavi *et al.* 2009, Czeczuga *et al.* 2010, 2011, 2015a, Hussein *et al.* 2013, Vega-Ramirez *et al.* 2013, Lau *et al.* 2018, Dubey *et al.* 2018).

Saprolegnia foi o segundo gênero mais abundante (UPD= 45 e UP= 39), com representatividade em quase todos os locais amostrados (**tabela 1**). Sua presença nos sistemas já era prevista, uma vez que espécies do gênero tem sido responsabilizadas por importantes perdas na aquicultura (Willoughby *et al.* 1984, Hatai *et al.* 1990, Ogbonna & Alabi 1991, Willoughby & Roberts 1992, Kitancharoen & Hatai 1996, Hatai &

Hoshiai 1993, 1994, Czczuga & Kiziewicz 1999, Hussein *et al.* 2001, Verma 2008, Czczuga *et al.* 2010, Chauhan 2014, Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015, Thoen *et al.* 2016, Lone & Manohar 2018, Rezinciuc *et al.* 2018, do Nascimento *et al.* 2020).

Ainda dentro de Saprolegniales, o gênero *Plectospira* teve destaque com relevante abundância (UPD= 40 e UP= 42), ocorrendo em quase todas as amostras de água, mas com ausência em ovos e peixes mortos (**tabela 1**). Este gênero possui cinco espécies válidas (www.mycobank.org), porém, somente *P. myriandra*, comumente citada na literatura como patógena em plantas (Drechsler 1927, 1929, 1953, Watanabe 1987), foi isolada no presente estudo, com frequência expressiva em ambas as unidades (F%= 85). No Brasil, há o registro de duas espécies, *P. myriandra* e *P. gemmifera*, as quais foram coletadas em diferentes ecossistemas como sapróbias em amostras de água e solo (Gomes *et al.* 2003, Rocha 2006, Miranda & Pires-Zottarelli 2012, Jesus *et al.* 2013, Jerônimo *et al.* 2017, Lustosa & Rocha 2019, Saraiva & Rocha 2019), com os últimos autores tendo isolado *P. myriandra* em amostras de solo próximo a criatórios de tilápia, no entanto, não há relato deste gênero em pisciculturas, nem como parasita de peixes e seus ovos.

Outros gêneros de Saprolegniales ocorreram com menor representatividade, como *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Newbya* e *Thraustotheca* (**tabela 1**), totalizando 53 espécimes na UPD, e 48 na UP. Todos estes gêneros possuem relatos em truticultura (Fregeneda-Grandes *et al.* 2001, 2007, Mousavi *et al.* 2009, Czczuga & Woronowicz 1993, Czczuga *et al.* 2015a, Vega-Ramirez *et al.* 2013), sendo conhecidamente as espécies de *Aphanomyces* importantes patógenas de animais e plantas ao redor do mundo (Srivastava & Srivastava 1978, Willoughby *et al.* 1995,

Lilley *et al.* 2003, Gaulin *et al.* 2007, Philips *et al.* 2008, Diéguez-Uribeondo *et al.* 2009, Saylor *et al.* 2010, Sarowar *et al.* 2014, Czczuga *et al.* 2015b, Afzali *et al.* 2013, 2015, Yadav *et al.* 2016, Martín-Torrijos *et al.* 2017, Iberahim *et al.* 2018, Sarowar *et al.* 2019b, Kumar *et al.* 2020).

A ordem Peronosporales *s.l.* esteve representada por três gêneros, *Phytophthium*, *Pythiogeton* e *Pythium* (**tabela 1**), os quais não tem grande representatividade em termos de patogenia em peixes e seus ovos, quando comparados com os representantes de Saprolegniales. *Pythium* foi o gênero mais abundante (UPD= 25 e UP= 41), sendo algumas poucas espécies relatadas em sistemas de cultivo e em ovos de peixe (Czczuga 1996, Czczuga *et al.* 2010, Rahman & Sarowar 2016, Sarowar *et al.* 2019b), porém não é conhecida a relação com a patogenia primária dos peixes ou de outros organismos aquáticos (Rahman & Sarowar 2016). Estudo realizado por Sarowar *et al.* (2019b) relaciona a presença de plantações ao redor de áreas de cultivo de peixe como possíveis responsáveis pela presença de espécies do gênero nestes ambientes. Como relatado por Naznin *et al.* (2017), espécies de oomicetos podem também utilizar rotas aquáticas para se espalhar por florestas e campos de cultivo, o que facilita sua propagação nos mais diferentes ambientes.

Olpidiopsidales *s.l.* foi representada pelo gênero *Olpidiopsis*, cujas espécies são parasitas obrigatórios de oomicetos e outros organismos (Karling 1981, Sekimoto *et al.* 2009, Rocha *et al.* 2018a, Buaya & Thines 2020). No presente estudo, espécies do gênero foram registradas parasitando outros oomicetos, como espécimes dos gêneros *Achlya* e *Saprolegnia*, que colonizaram os ovos de truta arco-íris (**tabela 1**). Com poucos estudos, *Olpidiopsis* foi sugerido como um biocontrole de oomicetos que parasitam ovos e peixes, juntamente com bactérias e outros fungos (Willoughby 2003).

Sabe-se que seu parasitismo limita o crescimento do hospedeiro, causando hipertrofia das hifas e diminuição do metabolismo pelo consumo de suas fontes energéticas (Sparrow 1960). Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que as espécies de *Olpidiopsis* tem importante potencial para auxiliar no combate aos oomicetos patogênicos, agindo como um biocontrole, mesmo que seus mecanismos ainda sejam desconhecidos, necessitando de pesquisas que possibilitem a obtenção do cultivo *in vitro* das espécies, o que permitiria estudos mais aprofundados do gênero.

De forma geral, os gêneros *Achlya*, *Plectospira* e *Saprolegnia* foram os mais frequentes nas amostras de água analisadas, enquanto *Leptolegnia*, *Phytophthium* e *Thraustotheca* os menos frequentes, evidenciado na tabela 1. Estudos sugerem que a presença de organismos zoospóricos em ecossistemas aquáticos parece ser dependente da metodologia utilizada, como a amostragem e as iscas utilizadas, bem como das flutuações dos parâmetros ambientais, com mudanças na composição das espécies e estrutura da comunidade (Shearer *et al.* 2007, Marano *et al.* 2008, Marano *et al.* 2011, Nascimento *et al.* 2011, Chauhan 2014). Neste estudo, a maioria das espécies foi registrada como sapróbia e isolada de sementes de *Sorghum* sp., isca comumente utilizada em estudos com oomicetos (Gomes & Pires-Zottarelli 2006, 2008, Pires-Zottarelli & Rocha 2007, Miranda & Pires-Zottarelli 2012, Jesus *et al.* 2013, Marano *et al.* 2014, Rocha *et al.* 2014, entre outros).

Como resultados da raspagem da epiderme dos peixes mortos coletados foram identificados representantes dos gêneros *Achlya* (2), *Leptolegnia* (1), *Newbya* (1), *Pythiogeton* (1), *Pythium* (2) e *Saprolegnia* (3) (**tabela 1**). Neste estudo, os peixes mortos foram registrados somente na UP, a qual passou por reformas durante as coletas, com prováveis deslocamentos das trutas, o que pode ter causado a perda de alguns

peixes pela perturbação do equilíbrio ambiental. É de conhecimento geral na piscicultura que peixes se tornam suscetíveis à infecção por oomicetos quando estão feridos ou com doença preexistente, o que prejudica na resistência imunológica do hospedeiro (Carballo *et al.* 1992, Blazer *et al.* 1999, Phillips *et al.* 2008, Sarowar *et al.* 2014, Duan *et al.* 2018). Embora haja preferência destes organismos para o parasitismo em peixes e seus ovos (Duan *et al.* 2018), não é possível afirmar a causa da morte dos peixes em questão. É provável que os oomicetos registrados nos peixes mortos atuaram como sapróbios, o que corrobora com estudos que contextualiza esses organismos como tal (Czeczuga *et al.* 2015a, b, Phillips *et al.* 2008, Duan *et al.* 2018). No Brasil, há poucos estudos reportando oomicetos em peixes, no entanto, a maioria dos registros se refere aos representantes da ordem Saprolegniales, especialmente *Saprolegnia* (Tavares-Dias *et al.* 2002, Pinheiro *et al.* 2015, Carraschi *et al.* 2018).

Dos ovos colonizados foram identificados representantes dos gêneros *Achlya* (3), *Aphanomyces* (1), *Dictyuchus* (2), *Leptolegnia* (1), *Olpidiopsis* (2), *Pythium* (2) e *Saprolegnia* (3) (**tabela 1**). Espécimes dos gêneros *Achlya* e *Saprolegnia* foram os mais frequentes nos ovos, estando parcialmente de acordo com o levantamento de Czeczuga *et al.* (2011), os quais relataram o gênero *Achlya* como sendo mais frequente em ovos de salmão na Polônia. De forma oposta, Fregeneda-Grandes *et al.* (2007) registraram somente o gênero *Saprolegnia* colonizando os ovos de truta marrom na Espanha. Todavia, ovos de salmonídeos são frequentemente colonizados por espécies de *Saprolegnia* (Thoen *et al.* 2011, Songe *et al.* 2016, Korzelecka-Orkisz *et al.* 2016), o que permiti inferir que esse gênero é o principal e mais importante patógeno nos ovos. No presente estudo, além de *Achlya* e *Saprolegnia*, outros gêneros foram registrados nos ovos, o que corrobora um levantamento de oomicetos realizado no Japão, onde

foram registrados espécimes de *Aphanomyces*, *Pythium* e *Saprolegnia* em ovos de salmão, os quais foram identificados com auxílio de estudos moleculares (Sakagushi *et al.* 2019). Estudos comprovaram que os ovos colonizados podem agir como substrato nos incubatórios, sendo desejável que ovos gorados sejam eliminados em prol da sobrevivência dos demais (Meyer 1991, Paxton & Willoughby 2000). Nas truticulturas estudadas, o principal e mais utilizado método de prevenção de oomicetos inclui a seleção manual, minuciosa e periódica dos ovos gorados e contaminados, por meio de pinças, o que diminui as chances de disseminação dos oomicetos para os demais ovos. Este processo é realizado comumente em incubadoras de gavetas, do tipo californiano, onde há acesso aos ovos durante cultivo. Quando utilizado incubadoras tubulares, que não permite acesso aos ovos, é comumente realizado banho de Bronopol com fluxo interrompido. Este tratamento está associado à produção de ovos em larga escala, o que não é comum no Brasil, com exceção da UPD, a qual é responsável pela transferência anual de ovos de truta para 50 produtores. Também para o sistema de circulação fechado, do tipo tubular, há outro tipo de tratamento, dito ser de grande eficiência, que é a exposição à luz ultravioleta (UV), a qual já é utilizada na UPD. Embora o tratamento com UV tenha comprovado ser eficiente (Rigolino & Tabata 2011, Tabata *et al.* 2011), os custos necessários para a quantidade de água utilizada em todo sistema seriam inviáveis. Foi verificado durante todo o período de estudo, nas truticulturas amostradas, que os métodos de prevenção e controle utilizados nos sistemas podem ser considerados eficientes, uma vez que não foram encontrados peixes doentes, nem sinais de infecção nos mesmos, durante o período de estudo. Esta afirmativa é defendida também por um estudo realizado na Noruega, com análise da quantidade de esporos de oomicetos presentes na água dos cultivos de salmão, onde embora tenha havido presença

expressiva de esporos na água, não houve o aparecimento da doença, nem mesmo problemas relevantes na eclosão de ovos (Thoen *et al.* 2016).

Os resultados obtidos nas duas truticulturas, quando considerados todos os locais amostrados, incluindo peixes e ovos, mostram uma quantidade discretamente maior de oomicetos nas entradas e saídas dos sistemas (**tabela 1**), o que pode ser justificada pela presença relevante de matéria orgânica na água, a qual foi coletada antes do processo de filtração. Esta matéria orgânica é representada principalmente por material vegetal em decomposição nas entradas dos sistemas, indicando a importância da filtração da água utilizada, já enfatizada por Rigolino & Tabata (2011), bem como pelo acúmulo de dejetos provenientes dos processos metabólicos e incremento da ração dos peixes nas saídas dos sistemas. Em teoria, pode-se inferir que uma filtração mais efetiva da matéria orgânica particulada proveniente da água que entra em um sistema de cultivo, diminuiria a quantidade de propágulos de oomicetos encontrados nos tanques de criação, todavia, o tamanho dos zoósporos destes organismos (em média de 7–12µm de diâmetro), torna-se um obstáculo, pois barreiras compostas por telas mais finas que as utilizadas nas duas truticulturas (grades de ferro com vão de 2,5cm diâmetro + tela de 1mm) criaria dificuldades para o fluxo da água, impedindo a oxigenação adequada (saturação necessária de oxigênio dissolvido > 80), fundamental para o cultivo da truta arco-íris, ao lado do monitoramento do pH (variação de 6–9) e da temperatura (≤ 20), parâmetros já mencionados anteriormente. No que se refere à maior presença de oomicetos nas saídas dos sistemas, foi comprovado que este é um ambiente rico em nutrientes pelo acúmulo de dejetos provenientes do processo de criação da truta (Caramel *et al.* 2014), que inclui secreções dos peixes e resquícios da ração ofertada, o que torna o ambiente eutrofizado (Sampaio *et al.* 2019), e propício para o

desenvolvimento de oomicetos, conforme relatado em diversos estudos (Czeczuga 1996, Czeczuga & Kiziewicz 1999, Czeczuga *et al.* 2015c, Rankovic 2004, Riethmüller & Langer 2004, Riethmüller *et al.* 2006).

Os dados obtidos no presente estudo permitem supor que a água pode ser considerada a principal via de introdução destes organismos dentro das truticulturas. Esta afirmação é fundamentada na morfologia dos oomicetos, os quais possuem zoósporos, que permitem sua mobilidade por meio de mecanismos específicos de locomoção e direcionamento, fazendo com que a água se torne o principal meio de sua disseminação (Alexopoulos *et al.* 1996, Moore-Landecker 1996, Walker & van West 2007, Beakes *et al.* 2014). Zoósporos, especialmente de Saprolegniales, são conhecidos por apresentarem poliplanetismo, o que permite o encistamento e germinação de forma contínua, até o encontro de um substrato ou de um hospedeiro compatível, o que se dá por quimiotaxia (El-Feki *et al.* 2003, Santurio *et al.* 2006, Phillips *et al.* 2008, Yang *et al.* 2013, Hosseini *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2016, Duan *et al.* 2018, Judelson & Ah-Fong 2018). Contudo, parece que ainda não se conhece totalmente os mecanismos de dispersão dos oomicetos, pois recente estudo realizado no Japão (Sakaguchi *et al.* 2019), relata a presença destes organismos no ar dos incubatórios de ovos de salmão, com a detecção das mesmas espécies que ocorreram na água dos incubatórios analisados, sugerindo um novo meio de dispersão, resultado que necessita de outros estudos que possam explicar tal evento.

5.3. Distribuição dos oomicetos, durante o período de coleta, nas truticulturas estudadas

Na tabela 2 são apresentados os resultados obtidos nos tanques de cultivo, nas entradas e saídas dos sistemas, bem como na água dos ovos e alevinos, visando à comparação da ocorrência e distribuição dos oomicetos nos meses mais quentes e frios do período de coleta. Somente dados que constam das duas truticulturas foram aqui considerados, permitindo padronizar os dados para comparação sazonal. De acordo com as temperaturas médias do ar mencionadas no item 5.1. (**figura 10**), é possível afirmar que agosto/2016 e junho/2017 correspondem aos meses mais frios do período de estudo. Comparando os registros obtidos nas duas truticulturas, a abundância aponta que o maior número de espécimes ocorreu nos meses mais frios (**tabela 2**), embora com diferença não significativa ($p < 0,05$). Estudos apontam que surtos por oomicetos, principalmente de Saprolegniales, teriam preferência por temperaturas mais baixas da água (Willoughby 2003, Czczuga *et al.* 2011, Chauhan 2014), sendo esta diretamente influenciada pela temperatura ambiental. De fato, problemas com saprolegniose são reportados em períodos mais frios do ano para diferentes espécies de peixes (Mastan & Ahmad 2018), como por exemplo, os bagres de canal cultivados nos EUA, com surtos da doença registrados com intensidade durante o frio vigoroso do local (Bly *et al.* 1993). No Brasil, a temperatura da água para o cultivo da truta é monitorada periodicamente, necessitando permanecer entre 10°C e 20°C (Tabata & Portz 2004, Caramel *et al.* 2014), com cultivos do peixe somente em regiões que são favoráveis à esta variação de temperatura. As temperaturas amenas registradas na cidade de Campos do Jordão na maior parte do período de coleta, a discreta diferença das temperaturas médias entre os meses amostrados, bem como o controle da vazão da água nos sistemas,

fatores que interferem diretamente na temperatura da água, poderiam justificar a diferença não significativa entre o número de espécimes obtidos na água nos meses mais frios e quentes do período de estudo.

Com base na ocorrência e distribuição de oomicetos, conclui-se que estes organismos estiveram presentes, com maior ou menor frequência em todo o sistema analisado, das duas truticulturas, com exceção para alguns ovos coletados (**tabela 1**). Mesmo com a presença efetiva dos oomicetos nos sistemas de cultivo, não houve registro de patogenicidade, no entanto, os dados obtidos servem de alerta, considerando que espécies deste grupo podem agir como patógenos oportunistas, sendo importante o conhecimento das espécies presentes e seu possível controle.

5.4. Riqueza em espécies de oomicetos, no período de estudo, nas truticulturas estudadas

De 535 espécimes obtidos nas duas truticulturas estudadas, 33 táxons pertencentes ao filo Oomycota foram identificados, sendo 24 representantes de Saprolegniales, seis de Peronosporales *s.l* e três de Olpidiopsidales *s.l*. (**tabela 3**). Dentre os táxons, 23 foram identificados em nível específico, com todas as espécies sendo citadas pela primeira vez para cidade de Campos do Jordão. *Newbya oblongata*, *Phytophthium litorale* e *Pythiogeton abundans* são primeira citação para o Brasil, bem como *Aphanomyces brasiliensis* uma espécie nova para a ciência, a qual foi devidamente publicada na revista Phytotaxa (Pires-Zottarelli *et al.* 2019, **anexo 1**).

Tabela 2. Espécimes de oomicetos registrados nas duas truticulturas (**UPD:** Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento; **UP:** Unidade Particular) estudadas, agrupados em seus respectivos gêneros, nos locais amostrados. **ES:** água que entra nos sistemas de tanques; **EL:** Entrada de água no laboratório; **TJ:** tanques com peixes juvenis; **TA:** tanques com peixes adultos; **S:** Saída de água de todo o sistema; **SS:** Saída do sistema de tanque; **AA:** água dos incubatórios dos alevinos; **AB:** abundância foi calculada pela soma dos espécimes nas coletas e também nos meses mais frios (Agosto/2016+Junho/2017); **ABF,** e mais quentes (Novembro/2016+Março/2017): **ABQ**

UPD	Primeira coleta (Agosto/2016)								Segunda coleta (novembro/2016)								Terceira coleta (março/2017)								Quarta coleta (junho/2017)									
	Gênero/coleta	ES	EL	TJ	TA	S	SS	AA	AB	ES	EL	TJ	TA	S	SS	AA	AB	ES	EL	TJ	TA	S	SS	AA	AB	ES	EL	TJ	TA	S	SS	AA	AB	ABF
<i>Achlya</i>	2	3	10	7	1		3	26	1	1	2	1	2	1	1	9		1	2			1		4	3	1	9	8			1	22	48	13
<i>Aphanomyces</i>				1				1			3	2	2		2	9	1	1	2	3	2		3	12			1		1	2		4	5	21
<i>Dictyuchus</i>			1		1	1		3		1	2	2				5				1				1					2	1		3	6	6
<i>Leptolegnia</i>																				1				1										1
<i>Newbya</i>							2	2																				1	1	2		4	6	0
<i>Olpidiopsis</i>												1	1			2									1							1	1	2
<i>Plectospira</i>	1	1	2	3	1	1	1	10	3	1	3	3		2	12	2	1	2	3	1	1	1	11			1	5	1			7	17	23	
<i>Pythiogeton</i>	1			2				3	3			1	1		5	2			1				3	3			2	1			6	9	8	
<i>Pythium</i>				6	1	2	2	11		2			2	3	7											1	2	2			5	16	7	
<i>Saprolegnia</i>				5	4	3	1	13	1			4			5		2	3					2	7			1	4	3	2		10	23	12
<i>Thraustotheca</i>		1						1																					2		2	3	0	
Total de espécimes	4	5	24	18	8	7	4	70	8	5	10	14	8	6	3	54	5	5	5	3	3	2	6	39	6	2	13	22	11	9	1	64	134	93
UP	Primeira coleta (Agosto/2016)						Segunda coleta (novembro/2016)						Terceira coleta (março/2017)						Quarta coleta (junho/2017)															
Gênero/coleta	ES	EL	TJ	TA	S	AB	ES	EL	TJ	TA	S	AB	ES	EL	TJ	TA	S	AB	ES	EL	TJ	TA	S	AB	ABF	ABQ								
<i>Achlya</i>	4	1	4	2	4	15	3	2	9	5	4	23	3	1	2	3		9	2	3	8	13	3	29	44	32								
<i>Aphanomyces</i>			1	1		2		2			1	3			1			1				1		1	3	4								
<i>Dictyuchus</i>				1		1				2		2	4		3	3		10	1	1	1			2	3	12								
<i>Leptolegnia</i>					1	1						0												0	1	0								
<i>Newbya</i>		2	4	3		9			1			1							2			3	2	7	16	1								
<i>Olpidiopsis</i>							1					1	1					1					1	1	1	2								
<i>Plectospira</i>	1		7	6		14	2	2	7	2	2	15	1			2	1	4	1	1	1	3		5	19	19								
<i>Phytophythium</i>						0				2	1	3			2			2					1	1	1	5								
<i>Pythiogeton</i>						0				1		1	3	1	3	1		8	2	2				4	4	9								
<i>Pythium</i>	2	3	4	4	5	18	4		6	3	3	16		3	1			4	1					1	19	20								
<i>Saprolegnia</i>				6	2	8		1		3	3	7			3	2	1	6		3	3	1	2	7	15	13								
Total de espécimes	7	6	26	17	12	68	10	7	23	18	14	72	12	5	15	4	2	45	9	6	13	21	9	58	126	117								

De maneira geral, a análise da estrutura da comunidade revelou uma micota diversa em ambas as truticulturas, mostrado pelo índice de Shannon ($H' = 2,82$ e $2,98$), e com poucos táxons dominantes, expressos pela dominância de Simpson ($D = 0,91$ e $0,93$), e distribuídos de maneira não totalmente uniforme pela equitatividade ($E = 0,64$ e $0,63$) para UP e UPD, respectivamente. A riqueza em espécies na UP foi de 26 e na UPD foi de 31, com 84% de similaridade segundo o índice de Sørensen. *Achlya orion*, *Aphanomyces brasiliensis*, *Saprolegnia terrestris* e *Thraustotheca clavata* estiveram presentes somente na UPD, enquanto *Phytopythium litorale* somente na UP, todas apresentando baixa frequência e abundância. *Achlya radiosa*, *Plectospira myriandra* e *S. diclina* foram as espécies mais frequentes, e *A. radiosa*, *A. caroliniana* e *P. myriandra* as mais abundantes nas truticulturas estudadas (**tabela 3**).

No Brasil, com exceção para as primeiras citações e a nova espécie, todas as demais já foram relatadas como sapróbias, de diferentes substratos, em amostras de água e solo de áreas de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (Rocha 2002, Milanez *et al.* 2007, Maia *et al.* 2015, Macedo & Rocha 2017, Santos & Rocha 2017, da Silva & Rocha 2017, Rocha *et al.* 2018a, Trindade & Rocha 2018, Machado & Rocha 2019, Saraiva & Rocha 2019). Somente *Aphanomyces laevis* e *Saprolegnia aenigmatica* são espécies citadas de piscicultura no país, as quais foram isoladas de lesões preexistentes de tilápias (Costa *et al.* 2010, Carraschi *et al.* 2018), no entanto, é comum no país as identificações se limitarem a gênero (Tavares-Dias *et al.* 2002, Pinheiro *et al.* 2015). Este é o primeiro estudo em truticultura no Brasil.

Tabela 3. Espécies de oomicetos registradas nas duas truticulturas estudadas (**UP:** Unidade Particular. **UPD:** Unidade de Pesquisa e desenvolvimento). **E:** táxons registrados nas entradas dos sistemas; **S:** táxons registrados nas saídas; **Ta:** táxons registrados nos tanques; **Lab:** táxons registrados em amostras de água coletadas dentro do laboratório (banhando ovos e alevinos); **Pe:** táxons registrados nos peixes; **AB:** abundância (calculada pela soma das ocorrências dos táxons); **F%:** frequência (calculada com base na presença e ausência nos locais de coleta)

Táxons/locais de coleta	UP								UPD							
	E	S	Ta	Lab	Ovos	Pe	AB	F%	E	S	Ta	Lab	Ovos	AB	F%	
Reino Straminipila																
Filo Oomycota																
Ordem Saprolegniales																
Família Achlyaceae																
<i>Achlya caroliniana</i> Coker	9	1	12	3	1		26	86	2	4	16			22	50	
<i>A. orion</i> Coker & Couch											1			1	17	
<i>Achlya</i> sp.1		1	3				4	29								
<i>Achlya</i> sp.2		1	5				6	29	3		8	4		15	67	
<i>Achlya</i> sp.3	2		5				7	29	1		2	2		5	50	
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i> Coker & Braxton	2		7	1			10	43		4	5		1	10	50	
<i>Dictyuchus</i> sp.1	3		3				6	29	1	1	1	1	1	5	82	
<i>Thraustotheca clavata</i> (de Bary) Humphrey									1	2				3	32	
Família Saprolegniaceae																
<i>Leptolegnia</i> sp.1		1				1	2	14			1		1	2	32	
<i>Newbya apiculata</i> (de Bary) M.W. Dick & Mark A. Spencer	3		4			1	8	29		4	1			5	32	
<i>N. oblongata</i> (de Bary) Mark A. Spencer	1	2	7	2			12	86		1				1	17	
<i>Saprolegnia aenigmatica</i> Sand-Sierra & Diég.-Urib.			8			2	10	14			2			2	17	
<i>S. diclina</i> Humphrey	1		6	6		1	14	86		4	12	6	1	23	67	
<i>S. ferax</i> (Gruith.) Kütz.			4				4	14			2			2	17	
<i>S. parasitica</i> Coker	1		8	2			11	43	1	2	5			8	50	
<i>S. terrestris</i> Cookson										2		1	2	5	50	
<i>Saprolegnia</i> sp.1									2	1		2		5	50	
Família Verrucalvaceae																
<i>Aphanomyces brasiliensis</i> C.L.A Pires-Zottarelli & A.L. Jesus									1	1				2	17	
<i>A. laevis</i> de Bary		1	1	2			4	43			2			2	17	
<i>A. stellatus</i> de Bary	2		1				3	29	2	3	4	1		10	82	
<i>Aphanomyces</i> sp.1			2	1			3	29		2	6	2		10	50	
<i>Aphanomyces</i> sp.2											2		1	3	32	
<i>Plectospora myriandra</i> Drechsler	7	3	28	4			42	100	10	6	22	2		40	67	
Incertae sedis																
<i>Achlya radiosa</i> Coker	8	8	21	6	1	3	47	100	6	1	12	3	1	23	100	
Ordem Peronosporales s.l.																
Família Peronosporaceae s.l.																
<i>Phytophthium litorale</i> (Nechw.) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque		2	4				6	29								
Família Pythiaceae s.l.																
<i>Pythiogeton abundans</i> J.H. Huang, C.Y. Chen & Y.S. Lin	8		5			1	14	29	9	2	6			17	50	
<i>Pythium segnitium</i> B. Paul	5	1	2	1			9	86		1	4		1	6	50	
<i>P. undulatum</i> H.E. Petersen	1	3	1				5	43	2	2				4	32	
<i>Pythium</i> sp.1							0			2	1			3	32	
<i>Pythium</i> do grupo F	7	4	15			1	27	43		6	5		1	12	50	
Ordem Olpidiopsidales s.l.																
Família Olpidiopsidaceae s.l.																
<i>Olpidiopsis achlyae</i> McLarty	1						1	14	1				1	2	32	
<i>O. aphanomycis</i> Cornu	1						1	14		1	1			2	32	
<i>O. saprolegniae</i> (A. Braun) Cornu			1				1	14				1	1	2	32	
Total de espécimes							283							252		

5.4.1. Saprolegniales nas truticulturas estudadas

5.4.1.1. Família Achlyaceae

Dentro da família Achlyaceae foram identificados oito táxons, com três espécies pertencentes ao gênero *Achlya*, *A. caroliniana*, *A. orion* e *A. radiosa*, contudo, esta última espécie foi mantida em *incertae sedis*, devido aos resultados das análises filogenéticas obtidos neste estudo (**tabela 3**). *Achlya radiosa* teve destaque dentro das truticulturas estudadas por ocorrer com 100% de frequência, e expressiva abundância (UP= 46, UPD= 23). A espécie tem relatos em ovos de truta arco-íris (Czeczuga *et al.* 2005, Czeczuga *et al.* 2015a), sendo considerada um conhecido patógeno de peixes (Sarowar *et al.* 2014), assim, os resultados obtidos aqui servem de alerta aos truticultores. Suas principais características morfológicas incluem ornamentações mamiformes ou duplo-mamiformes na parede do oogônio, formação de único oósporo subcêntrico, com anterídios andróginos (Jonhson *et al.* 2002). No passado, a espécie foi inserida no gênero *Achlya* devido ao tipo de liberação primária dos zoosporângios, sendo esta aclióide (Johnson *et al.* 2002), no entanto, a espécie não possui oósporos excêntricos, característica importante a ser considerada dentro de Achlyaceae (Beakes *et al.* 2014, Rocha *et al.* 2018b). Riethmüller *et al.* (1999) realizaram estudos moleculares com a região LSU do rDNA, observando a separação do gênero *Achlya* em três agrupamentos, o que também foi corroborado por Leclerc *et al.* (2000), os quais observaram o posicionamento distinto das espécies de *Achlya s.s.* e incerto dentro de Saprolegniaceae, devido aos baixos suportes encontrados. Posteriormente, Spencer *et al.* (2002) criaram o gênero *Newbya*, com base na região SSU do rDNA, para espécies com oósporos subcêntricos e cêntricos, porém manteve *A. radiosa* com posicionamento incerto por não agrupar com as demais espécies de *Newbya*. Beakes *et al.* (2014) defendem a separação das espécies de *Achlya* com oósporos excêntricos dentro da

família Achlyaceae, criada pelos autores, embora informalmente, enquanto o gênero *Newbya* foi inserido em Saprolegniaceae. No aspecto morfológico, seria coerente que *A. radiosa*, bem como as espécies comprovadamente próximas, sendo estas, *A. colorata*, *A. racemosa* e *A. sparrowii* (Riethmüller *et al.* 1999, Choi *et al.* 2019), fossem incluídas no gênero *Newbya*, por definição. Com base nas pesquisas anteriores, neste estudo foi realizada uma análise concatenada para as regiões LSU e SSU rDNA (**tabela 4**), com alguns representantes da ordem Saprolegniales (**figura 11**). Os resultados evidenciaram a separação do clado de *A. radiosa*, com aproximação em Achlyaceae. Fica evidente que o agrupamento deve ser posicionado em um novo gênero dentro da ordem, no entanto, pela definição apresentada em Rocha *et al.* (2018b) para a família Achlyaceae, o tipo de oósporo seria uma divergência morfológica no agrupamento. Diante do exposto, é encorajada a criação de um novo gênero para esta espécie e seu agrupamento, defendido pelo posicionamento filogenético, possivelmente dentro da família Achlyaceae, a qual precisará ter sua definição ampliada.

Ainda dentro do gênero *Achlya*, *A. caroliniana* foi registrada nos sistemas de cultivo de truta arco-íris, bem como nos ovos coletados na UP (**tabela 3**). As principais características desta espécie inclui 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 presentes, bastante ramificados e normalmente não atracando o oogônio (Coker 1923, Johnson 1956, Johnson *et al.* 2002). Análise concatenada das regiões ITS e LSU do rDNA (**tabela 5**) confirmam a identificação da espécie, bem como seu posicionamento em Achlyaceae, com o sequenciamento de cinco espécimes obtidos no estudo (**figura 12**). Há relatos da espécie causando infecções em peixe-leite e bonga na Nigéria (Ogbonna & Alabi 1991), bem como presentes em truticulturas na Polônia (Czeczuga *et al.* 2005,

Czczuga *et al.* 2015a), sendo a espécie considerada um conhecido patógeno de peixes (Sarowar *et al.* 2014).

Um representante de *Achlya orion* foi registrado no sistema, ocorrendo na UPD em amostra de água do tanque de cultivo (**tabela 3**). As principais características da espécie inclui a presença de pedúnculos enrolados e contorcidos, oósporos excêntricos, variando de 3–7, e anterídios andróginos (Johnson *et al.* 2002). Análise concatenada de Achlyaceae confirmam a identificação da espécie (**figura 12**), concordando com Rocha *et al.* (2018b), os quais sequenciaram e inseriram a espécie pela primeira vez em uma análise filogenética. A espécie é relatada como conhecido patógeno de peixes (Sati 1991, Sarowar *et al.* 2014), com registros também em ovos de salmão e truta arco-íris na Polônia (Czczuga *et al.* 2011, 2015a).

Tabela 4. Táxons, número em coleção e de acesso no GenBank de espécies da ordem Saprolegniales utilizadas na análise concatenada das regiões LSU e SSU rDNA. – : dados ausentes. N/A: dados não disponíveis. Em negrito, sequências obtidas no presente estudo. *Apodachlya brachynema* e *Atkinsiella dubia* foram utilizadas como grupo externo

Táxon	Código	LSU	SSU
<i>Achlya caroliniana</i>	CCIBt3870	KP006451	-
<i>Achlya caroliniana</i>	SCP04	N/A	N/A
<i>Achlya catenulata</i>	CCIBt4029	KP006449	N/A
<i>Achlya catenulata</i>	CPZ01	N/A	N/A
<i>Achlya difusa</i>	CPZ02	N/A	N/A
<i>Achlya flagellata</i>	CCIBt 3980	KR063221	-
<i>Achlya klebsiana</i>	CPZ06	N/A	\N/A
<i>Achlya orion</i>	CCIBt3984	KT964700	-
<i>Achlya orion</i>	CCIBt4295	N/A	-
<i>Achlya prolifera</i>	GHJ39	MK818528	N/A
<i>Achlya proliferoides</i>	CCIBt4418	N/A	N/A
<i>Achlya radiosa</i>	CCIBt4676	MN880050	N/A
<i>Achlya radiosa</i>	CCIBt4679	MN880051	N/A
<i>Achlya radiosa</i>	CBS54767	JX115215	N/A
<i>Achlya radiosa</i>	CCIBt4296	MN880049	N/A
<i>Achlya racemosa</i>	CBS10338	JX115214	-
<i>Achlya sparrowii</i>	F2217	KP098356	KP098380

Tabela 4. Continuação

Táxon	Código	LSU	SSU
<i>Achlya truncatiformis</i>	CCIBt4341	N/A	N/A
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	CCIBt4545	N/A	N/A
<i>Aphanomyces cladogamus</i>	CCIBt3854	KT935289	N/A
<i>Aphanomyces raphani</i>	CCIBt4409	MK546598	N/A
<i>Aphanomyces helicoides</i>	CCIBt4331	N/A	N/A
<i>Aphanomyces laevis</i>	CBS127282	HQ395650	HQ343196
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4249	N/A	N/A
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4305	N/A	N/A
<i>Aplanopsis terrestris</i>	CCIBt 4037	KM058753	KT336499
<i>Aplanopsis terrestres</i>	CCIBt4030	N/A	N/A
<i>Apodachlya brachynema</i>	CBS55769	JX436350	-
<i>Atkinsiella dubia</i>	NJM0132	AB285221	AB284575
<i>Brevilegnia longicaulis</i>	CPZ 71	N/A	N/A
<i>Brevilegnia variabilis</i>	CPZ 37	N/A	N/A
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	CCIBt4345	N/A	N/A
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	SCP126	N/A	N/A
<i>Leptolegnia caudata</i>	CBS 68069	KP098357	-
<i>Leptolegnia chapmanii</i>	CEP 010	KT935280	-
<i>Leptolegnia chapmanii</i>	CEP 433	KT935281	-
<i>Newbya androgyna</i>	CPZ12	N/A	N/A
<i>Newbya apiculata</i>	CCIBt4313	N/A	N/A
<i>Newbya apiculata</i>	SCP53	N/A	N/A
<i>Newbya dichotoma</i>	MB808617	KP098361	-
<i>Newbya oblongata</i>	SCP70	N/A	N/A
<i>Newbya pascuicola</i>	CBS 57667	KP098359	-
<i>Plectopsira myriandra</i>	CCIBt4664	N/A	N/A
<i>Plectopsira myriandra</i>	CCIBt3992	KR063219	-
<i>Plectospira gemifera</i>	CCIBt4244	KX084707	N/A
<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>	CCIBt4107	KT935291	N/A
<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>	CCIBt3986	KT935290	N/A
<i>Protoachlya hypogyna</i>	CCIBt 4079	KP165040	-
<i>Protoachlya paradoxa</i>	CBS 15845	DQ393491	-
<i>Protoachlya paradoxa</i>	ATCC 44892	DQ393493	-
<i>Pythiopsis irregularis</i>	CCIBt 3985	KT935284	N/A
<i>Pythiopsis irregularis</i>	CCIBt4425	N/A	N/A
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	CCIBt4300	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	CCIBt4301	N/A	N/A
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4681	N/A	N/A
<i>Saprolegnia glomerata</i>	CCIBt4549	N/A	N/A
<i>Saprolegnia milanezii</i>	CCIBt4001	KX528020	-
<i>Saprolegnia parasitica</i>	SCP71	N/A	N/A
<i>Thraustotheca clavata</i>	CBS 34333	HQ665213	-
<i>Thraustotheca clavata</i>	CBS 55767	HQ665268	-

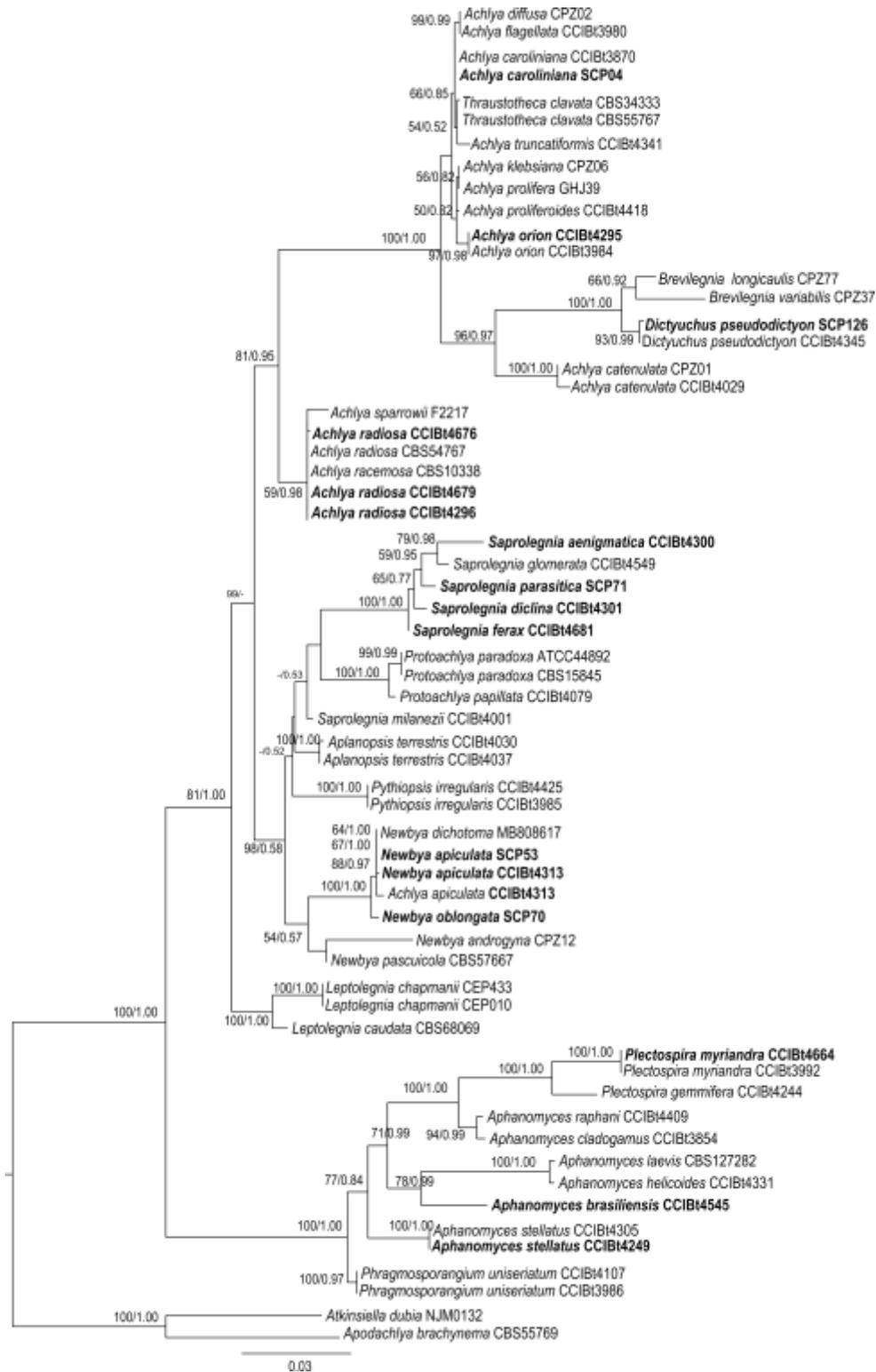


Figura 11. Análise filogenética de máxima verossimilhança de Saprolegniales, com seqüências concatenadas das regiões SSU e LSU do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior). Apenas valores maiores que 50% são indicados numericamente e aqueles abaixo de 50% são marcados com (-). As barras de escala representam o número médio de substituições por sítio. As seqüências deste estudo são indicadas em negrito.

Thraustotheca clavata teve três espécimes registrados, ocorrendo na UPD, em amostras de água da entrada e da saída dos sistemas, e ausente nos peixes mortos e ovos (**tabela 3**). As principais características desta espécie incluem o tipo de liberação dos zoósporos, que ocorre pela desintegração da parede dos zoosporângios, anterídios díclinos e oósporos excêntricos (Johnson *et al.* 2002). A análise concatenada das regiões ITS e LSU rDNA, evidenciam que o gênero *Thraustotheca* apresenta-se relacionado com espécies de *Achlya*, dentro da família Achlyaceae. A relação destes dois gêneros foi anteriormente apontada por Riethmüller *et al.* (1999), os quais questionaram a existência do gênero *Thraustotheca*. Contudo, o tipo de oósporo excêntrico está de acordo com o posicionamento filogenético dentro da família Achlyaceae (**figura 12**), concordando com a classificação de Beakes *et al.* (2014), e caracterização em Rocha *et al.* (2018b). Mesmo com poucos registros no presente estudo, há relato da espécie em ovos de salmão na Polônia (Czeczuga *et al.* 2005, Czeczuga *et al.* 2011), também em pele de piranha carnívora (Czeczuga *et al.* 2010), bem como parasitando peixe dourado na Nigéria (Sati 1991).

Tabela 5. Táxons, número em coleção e de acesso no GenBank de espécies de Achlyaceae utilizadas na análise concatenada das regiões ITS e LSU rDNA. – : dados ausentes. N/A: dados não disponíveis. Em negrito, sequências obtidas no presente estudo. *Saprolegnia ferax* foi utilizado como grupo externo

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Achlya ameriana</i>	N/A	AF218145	AF218179
<i>Achlya caroliniana</i>	CBS10635	AF218146	-
<i>Achlya caroliniana</i>	CCIBt3870	KP006458	KP006451
<i>Achlya caroliniana</i>	SCP153	N/A	N/A
<i>Achlya caroliniana</i>	SCP46	N/A	N/A
<i>Achlya caroliniana</i>	SCP64	N/A	N/A
<i>Achlya caroliniana</i>	CCBIBt4670	N/A	N/A
<i>Achlya caroliniana</i>	SCP04	N/A	N/A
<i>Achlya conspícua</i>	CBS10337	HQ643092	-
<i>Achlya conspícua</i>	N/A	AF218144	AF218182
<i>Achlya debaryana</i>	VKMF1904	KP098352	KP098355
<i>Achlya dúbia</i>	N/A	AF218155	AF218190
<i>Achlya flagellata</i>	CCIBt 3980	KR063222	KR063221

Tabela 5. Continuação

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Achlya flagellata</i>	CCIBt4396	N/A	N/A
<i>Achlya glomerata</i>	CBS10550	HQ643098	-
<i>Achlya glomerata</i>	N/A	AF218149	AF218185
<i>Achlya klebsiana</i>	CCIBt4339	N/A	N/A
<i>Achlya klebsiana</i>	CCIBt4357	N/A	N/A
<i>Achlya orion</i>	CCIBt4310	N/A	N/A
<i>Achlya orion</i>	CCIBt4384	N/A	N/A
<i>Achlya orion</i>	CCIBt4100	KT935272	KT935267
<i>Achlya orion</i>	CCIBt4295	N/A	N/A
<i>Achlya primoachlya</i>	CCIBt3982	KM058757	KM058754
<i>Achlya primoachlya</i>	AVM7	KX580959	KX395726
<i>Achlya prolifera</i>	NJM 9315	AY647196	-
<i>Achlya prolifera</i>	GHJ39	MK818528	MK818528
<i>Achlya proliferoides</i>	CCIBt4418	N/A	N/A
<i>Achlya spiralis</i>	F1409	AY676020	-
<i>Achlya recurva</i>	BHUBOTMMT147	MH685195	-
<i>Achlya recurva</i>	N/A	AF218152	AF218189
<i>Achlya truncatiformis</i>	CCIBt4341	N/A	N/A
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4249	N/A	N/A
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4305	MK513784	MK546599
<i>Brevilegnia longicaulis</i>	CPZ77	N/A	N/A
<i>Brevilegnia longicaulis</i>	CCIBt3989	KM245940	KM245939
<i>Brevilegnia minutandra</i>	295AH	KM061378	-
<i>Brevilegnia minutandra</i>	CCIBt3351	KT935275	KT935270
<i>Brevilegnia unisperma</i>	CBS14352	HQ643129	-
<i>Brevilegnia variabilis</i>	CPZ37	N/A	N/A
<i>Brevilegnia variabilis</i>	CPZ112	N/A	NA
<i>Brevilegnia variabilis</i>	CBS 110006		HQ665058
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	CCIBt 4108	KT935276	KT935271
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	CCIBt4345	MK818532	MK818544
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	CCIBt4677	N/A	N/A
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	SCP130	N/A	N/A
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	SCP126	N/A	N/A
<i>Dictyuchus pseudodictyon</i>	CCIBt4028	KT935276	KT935271
<i>Dictyuchus monosporus</i>	ATCC34931	FJ746662	-
<i>Dictyuchus monosporus</i>	GHJ35	MK818531	MK818543
<i>Thraustotheca clavata</i>	CCIBt4666	N/A	N/A
<i>Thraustotheca clavata</i>	CBS34333	HQ644018	-
<i>Thraustotheca clavata</i>	AVM2	KX580960	-
<i>Thraustotheca clavata</i>	CBS 55767	HQ644017	HQ665268
<i>Thraustotheca terrestris</i>	CBS109851	HQ644019	HQ665057
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4681	N/A	N/A
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4099	KT964708	KT964705



Figura 12. Análise filogenética de máxima verossimilhança de Achlyaceae sensu Beakes et al. (2014), com seqüências concatenadas das regiões ITS e LSU do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior). Apenas valores maiores que 50% são indicados numericamente e aqueles abaixo de 50% são marcados com (-). As barras de escala representam o número médio de substituições por sítio. As seqüências deste estudo são indicadas em negrito.

Ainda dentro da família Achlyaceae, o gênero *Dictyuchus* teve apenas uma espécie identificada, *Dictyuchus pseudodictyon*, com registros em amostras de água, bem como colonizando ovos de truta arco-íris (**tabela 3**). A espécie apresenta como principais características morfológicas a presença de anterídios díclinos e andróginos, normalmente vários atacando o mesmo oogônio, com formação de um único oósporo por oogônio, excêntrico (Johnson *et al.* 2002). O posicionamento filogenético confirmou a identificação da espécie com o sequenciamento de três espécimes obtidos neste estudo (**figura 12**). A análise evidencia que o gênero, mesmo dentro de Achlyaceae, parece ter divergido para uma separação ao longo da linhagem evolutiva, juntamente com o gênero *Brevilegnia*, ao qual é relacionado, concordando com resultados obtidos por Rocha *et al.* (2016b). Há muitos relatos de *Dictyuchus* spp. em pisciculturas (Van West 2006, Vega-Ramirez *et al.* 2013, Czczuga *et al.* 2011, 2015a), bem como parasita de peixes (Srivastava & Srivastava 1977, Sati 1991), com a espécie *D. monosporus* um conhecido patógeno (Sarowar *et al.* 2014), no entanto, não há registros de *D. pseudodictyon* em pisciculturas, nem mesmo em peixes e ovos.

5.4.1.2. Família Saprolegniaceae

Saprolegniaceae foi representada neste estudo por nove táxons, com sete espécies identificadas dentro dos gêneros *Newbya* e *Saprolegnia*, com este último apresentando o maior número de espécies identificadas, sendo estas *S. aenigmatica*, *S. diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica* e *S. terrestris*. Os estudos taxonômicos foram baseados em análises morfológicas e moleculares, considerando os resultados obtidos por Sandoval-Sierra *et al.* (2014b). Estes autores fizeram uma extensa revisão morfológica e molecular do gênero, analisando sequências depositadas no GenBank, com o desenvolvimento de um sistema de identificação molecular baseado em unidades

taxonômicas operacionais da região ITS (MOTUs - molecular operational taxonomic units), propondo modificações na identificação de muitas sequências depositadas.

Como resultado do presente estudo, *Saprolegnia diclina* foi a espécie mais abundante dentro do gênero (UP= 14, UPD= 23), ocorrendo como sapróbia, tanto nas amostras de água das truticulturas estudadas, bem como em ovos e peixes mortos de truta arco-íris (**tabela 3**). Thoen *et al.* (2015) registraram *S. diclina* como a espécie mais comum em incubatórios de salmão norueguês, ocorrendo com maior frequência nos ovos analisados. Embora *S. parasitica* seja relacionada ao parasitismo de peixes e ovos (Willoughby & Roberts 1992, Hatai & Hoshiai 1994, van West 2006, van den Berg *et al.* 2013, Belmonte *et al.* 2014, Chauhan 2014, Zaki & Fawazi 2015, Lone & Manohar 2018, Mastan & Ahmad 2018, Jaies *et al.* 2020), sendo considerada a espécie mais virulenta para peixes de água doce (Mastan *et al.* 2015), um menor número de registros foi obtido neste estudo (UP= 11, UPD= 8), não ocorrendo nos peixes mortos, nem nos ovos, mesmo que presente na água que os banhavam (**tabela 3**). Testes de patogenicidade indicaram *S. diclina* com as maiores taxas de infecção nos peixes e ovos, enquanto *S. parasitica* com taxas intermediárias (Thoen *et al.* 2016). Sequências de espécimes obtidos neste estudo, bem como de espécimes do GenBank com sequências disponíveis das regiões ITS e LSU rDNA (**tabela 6**), foram incluídas na análise concatenada (**figura 13**) e confirmam a identificação de *S. diclina* e *S. parasitica*, para as quais foi possível a obtenção de onze e quatro sequências, respectivamente, uma vez que a identificação molecular para estas espécies foi essencial, considerando as similaridades morfológicas entre elas (Diéguez-Uribeondo *et al.* 2007, van den Berg *et al.* 2013, Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015).

De forma semelhante, os resultados moleculares apresentados na análise concatenada das regiões ITS e LSU rDNA (**tabela 6**) da família Saprolegniaceae

(**figura 13**), auxiliaram na identificação de *Saprolegnia aenigmatica*, pois, de acordo com a descrição original, esta espécie não tem qualquer singularidade morfológica e apresenta similaridades com *S. parasitica* e *S. diclina* (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015). Estes autores identificaram a espécie com auxílio de estudos moleculares para a região ITS rDNA, com alguns dos espécimes identificados apresentando registros em ovos de truta. No presente estudo a espécie foi registrada nas truticulturas como sapróbia em amostras de água dos tanques, bem como nas saídas dos sistemas e nos peixes mortos da UP (**tabela 3**). Tendo em vista a ocorrência da espécie nas truticulturas, também em ovos de truta (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015) e em Tilápia (Carraschi *et al.* 2018), fica evidente que a espécie merece atenção quanto ao seu potencial patogênico, com dados que servem de alerta aos piscicultores.

Tabela 6. Táxons, número em coleção e de acesso no GenBank de espécies de Saprolegniaceae utilizadas na análise concatenada das regiões ITS e LSU rDNA. – : dados ausentes. N/A: dados não disponíveis. Em negrito, sequências obtidas no presente estudo. *Aphanomyces stellatus* foi utilizado como grupo externo

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4249	N/A	N/A
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt3994	KP006462	KP006454
<i>Aplanopsis terrestris</i>	CCIBt 4037	KM058756	KM058753
<i>Aplanopsis terrestris</i>	CCIBt4030	N/A	N/A
<i>Calyptralegnia achlyoides</i>	AR5	–	AF119593
<i>Leptolegnia caudata</i>	CBS 68069	KP098340	KP098357
<i>Leptolegnia chapmanii</i>	CEP 010	KT935277	KT935280
<i>Leptolegnia chapmanii</i>	CEP 433	KT935278	KT935281
<i>Newbya androgyna</i>	CPZ12	N/A	N/A
<i>Newbya androgyna</i>	CCIBt3993	KP006459	KP006452
<i>Newbya apiculata</i>	CCIBt4313	N/A	N/A
<i>Newbya apiculata</i>	SCP53	N/A	N/A
<i>Newbya dichotoma</i>	MB 808617	KP098345	KP098361
<i>Newbya oblongata</i>	CCIBt4299	N/A	N/A
<i>Newbya oblongata</i>	SCP70	N/A	N/A
<i>Newbya pascuicola</i>	CBS 57667	KP098347	KP098359
<i>Newbya pascuicola</i>	CBS 57767	KP098346	KP098358
<i>Protoachlya papillata</i>	CCIBt 4079	KP006461	KP165040

Tabela 6.Continuação

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Protoachlya paradoxa</i>	CBS 15845	DQ393553	DQ393491
<i>Protoachlya paradoxa</i>	ATCC44892	DQ393555	DQ393493
<i>Pythiopsis irregularis</i>	CCIBt 3985	KT213555	KT935284
<i>Pythiopsis irregularis</i>	CCIBt4425	N/A	N/A
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	RJBCC0023	KR872867	KX555486
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	CCIBt4300	N/A	N/A
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	CCIBt4324	N/A	N/A
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	SCP76	N/A	N/A
<i>Saprolegnia aenigmatica</i>	CCIBt4106	KT964707	KT964703
<i>Saprolegnia australis</i>	SAP0286	KF717961	KX555489
<i>Saprolegnia australis</i>	CBS30256	MH030585	HQ665197
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP116	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP115	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP47	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP101	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP121	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP122	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	CCIBt4301	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	CCIBt4671	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP113	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP104	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	SCP123	N/A	N/A
<i>Saprolegnia diclina</i>	CBS53667	HQ643978	HQ665254
<i>Saprolegnia diclina</i>	SAP1023	KF717796	–
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4099	KT964708	KT964705
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4681	N/A	N/A
<i>Saprolegnia ferax</i>	SAP0255	KF717884	KX555493
<i>Saprolegnia ferax</i>	CBS30537	DQ393565	HQ665199
<i>Saprolegnia monilifera</i>	CBS 55867	KF718133	HQ665270
<i>Saprolegnia monilifera</i>	SAP1450	KF718131	–
<i>Saprolegnia parasitica</i>	SCP71	N/A	N/A
<i>Saprolegnia parasitica</i>	SCP75	N/A	N/A
<i>Saprolegnia parasitica</i>	CCIBt4678	N/A	N/A
<i>Saprolegnia parasitica</i>	SCP62	N/A	N/A
<i>Saprolegnia parasitica</i>	SAP0208	KF717839	–
<i>Saprolegnia parasitica</i>	CBS22365	HQ644004	–
<i>Saprolegnia racemosa</i>	RJBCC0001	KR872845	KX555498
<i>Saprolegnia racemosa</i>	SAP1209	KF718122	–
<i>Saprolegnia subterranea</i>	SAP1293	KF718124	KX555499
<i>Saprolegnia subterranea</i>	GHJ	KX084703	KX115432
<i>Saprolegnia subterranea</i>	AVM03	X084706	KX115431
<i>Saprolegnia terrestris</i>	CCIBt4680	N/A	N/A
<i>Saprolegnia terrestris</i>	CCIBt4665	N/A	N/A
<i>Saprolegnia terrestris</i>	SAP1327	KF718138	KX555500
<i>Saprolegnia terrestris</i>	SAP1285	KF718134	–

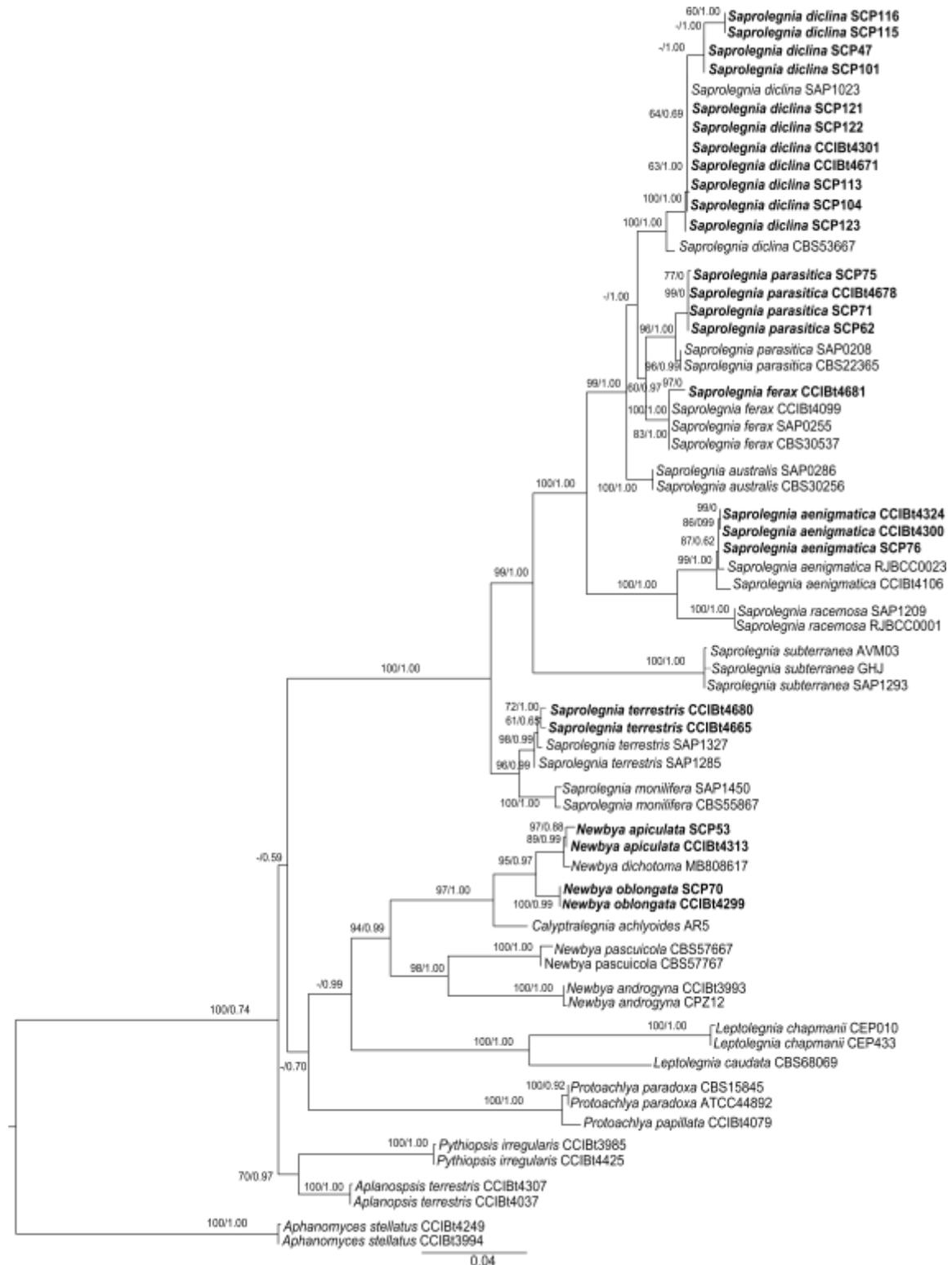


Figura 13. Análise filogenética de máxima verossimilhança de Saprolegniaceae *sensu* Beakes *et al.* (2014), com seqüências concatenadas das regiões ITS e LSU do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior). Apenas valores maiores que 50% são indicados numericamente e aqueles abaixo de 50% são marcados com (-). As barras de escala representam o número médio de substituições por sitio. As seqüências deste estudo são indicadas em negrito.

Outras duas espécies do gênero, *Saprolegnia terrestris* e *S. ferax*, foram registradas nos sistemas de cultivo com pouca representatividade. *Saprolegnia ferax*, espécie tipo do gênero, é conhecida por causar infecções em peixes e ovos (Srivastava & Srivastava 1977, Willoughby 1977, 2003, Willoughby *et al.* 1983, Sati 1991, Cao *et al.* 2012, Zahran & Risha 2013), no entanto, apenas seis espécimes foram identificados neste estudo, presentes em amostras de água coletadas dos tanques de cultivo, sem registros nos peixes e ovos analisados (**tabela 3**). A espécie é caracterizada por anterídios raros, presença de poros na parede do oogônio e oósporos subcêntricos (Seymour 1970). Estudos relatam que *S. ferax*, juntamente com *S. parasitica*, apresentam os maiores registros de infecção em peixes, principalmente em salmonídeos, sendo estes os peixes com mais estudos relacionados à saprolegniose, justificado pela grande importância econômica no cenário mundial da piscicultura (Willoughby 2003, do Nascimento *et al.* 2020). De forma oposta, as características morfológicas observadas nos espécimes de *S. terrestris* apresentaram diferenças expressivas, quando comparadas com a descrição de Seymour (1970) e com a monografia de Johnson *et al.* (2002). As principais diferenças incluem a ausência de anterídios observada em nosso espécime, juntamente com a presença constante de algumas hifas, zoosporângios e pedúnculo oogonial que se apresentaram curvados, contorcidos, enrolados e/ou em espiral, de forma bastante significativa (**figura 14**). Seymour (1970) reporta como principais características desta espécie a predominância de três a quatro oósporos por oogônio e anterídios andróginos, curtos e delicados. Johnson *et al.* (2002) descreveram os anterídios com crescimento próximo ao septo do oogônio e grande variação na quantidade dos oósporos, 2–11 por oogônio. Nos espécimes aqui estudados, os quais foram registrados nas saídas dos sistemas, bem como nos ovos e na água que banha os ovos (**tabela 3**), a quantidade de oósporo formado dentro dos oogônios é bastante

variável, (de 2–8) e os anterídios ausentes. O posicionamento das sequências obtidas neste estudo (**figura 13**), comprovam a identificação da espécie, em especial, com base nos estudos de Sandoval-Sierra *et al.* (2014b). Está claro que a espécie necessita de uma descrição mais abrangente, que contemple todas as variações morfológicas.

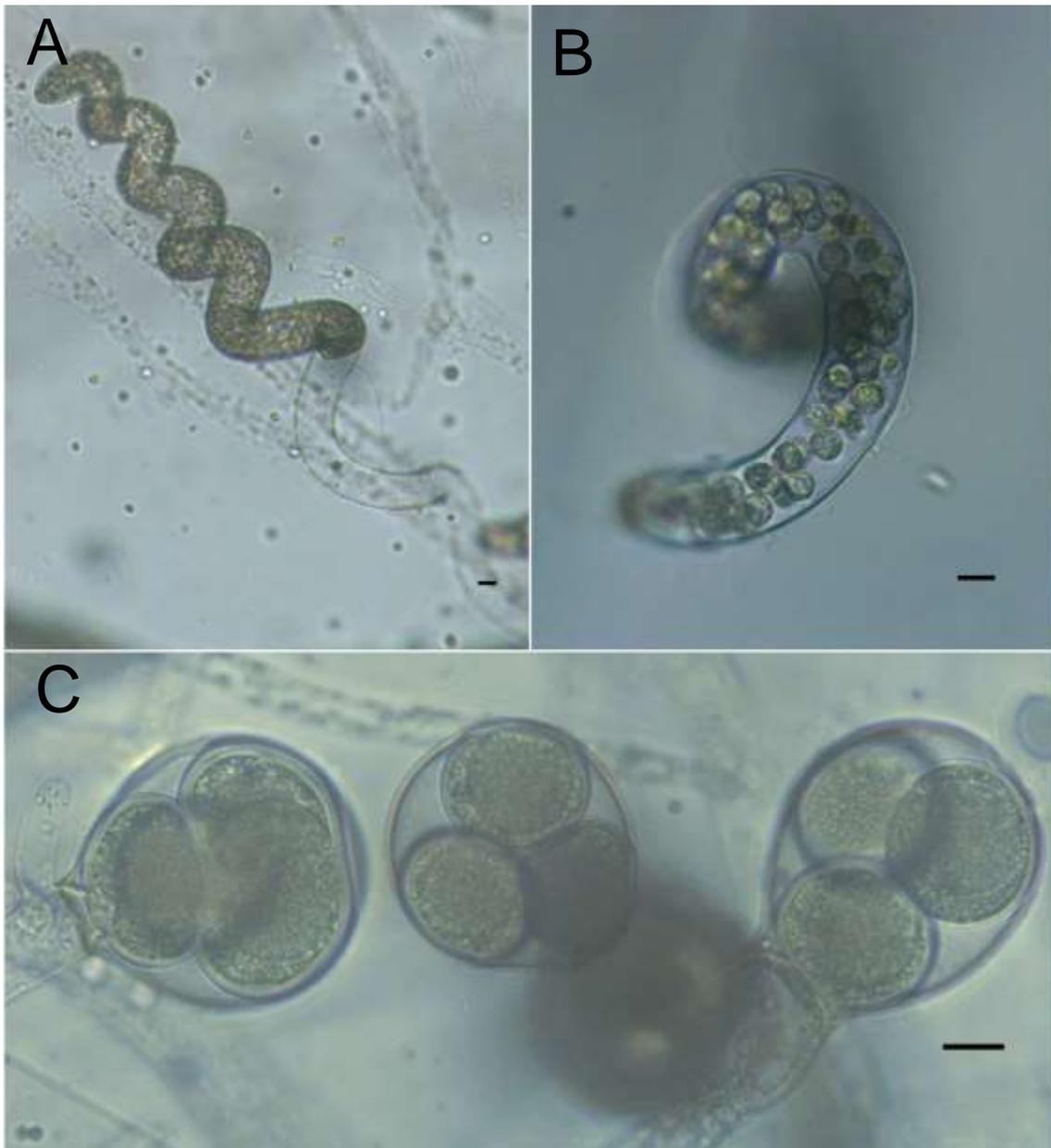


Figura 14. *Saprolegnia terrestris*. **A** – Hifa enrolada em espiral. **B** – Zooporângio contorcido com liberação saprolegnióide dos zoósporos primários. **C** – Oogônios com óosporos subcêntricos. Barra: 10 μm

Neste estudo, os registros das espécies do gênero *Newbya* trazem importantes contribuições para a ciência, com a identificação de duas espécies, *Newbya apiculata* e *N. oblongata*. *Newbya apiculata* foi registrada como sapróbia em amostras de água das entradas, saídas e tanques de cultivo, bem como no peixe morto como resultado da raspagem na epiderme do animal (**tabela 3**). A espécie já foi registrada em ovos de truta e salmão na Polônia (Czeczuga *et al.* 2005, 2011), bem como causando infecção em peixe-leite, bagre africano e carpa (Ogbonna & Alabi 1991). As principais características da espécie são a formação de oósporos subcêntricos e/ou cêntricos, alguns oogônios apiculados com pedúnculos curvados, pendentes e/ou enrolados (Johnson *et al.* 2002). *Newbya apiculata* pertenceu ao gênero *Achlya*, sendo transferida para *Newbya* por Spencer *et al.* (2002), com base nas características morfológicas e resultados filogenéticos da região SSU rDNA. Neste estudo, a região SSU foi sequenciada para esta espécie, sendo inserida na análise concatenada de Saprolegniales (**figura 11**), apresentando aproximação com a sequência disponível no GenBank (sequência AJ238656). De forma complementar, as regiões ITS e LSU rDNA são sequenciadas pela primeira vez para a espécie (**figura 13**), confirmando seu posicionamento dentro de *Newbya*. De forma semelhante, *N. oblongata* foi também transferida para o gênero *Newbya*, porém, somente as características morfológicas foram consideradas, tais como a formação de oósporos subcêntricos (Spencer *et al.* 2002). Os espécimes aqui identificados ocorreram como sapróbios em amostras de água, estando ausente nos ovos e peixes mortos analisados (**tabela 3**), entretanto, há

relatos da espécie em ovos de truta, bem como causando infecções em diferentes espécies de peixe (Czeczuga *et al.* 2005, 2010, Ogbonna & Alabi 1991). A espécie é caracterizada pela presença de oogônios ovalados, oósporos subcêntricos, algumas oosferas não maturando e não preenchendo todo o oogônio e anterídios díclinos (**figura 15**). Análises filogenéticas apresentadas no presente estudo comprovam o posicionamento da espécie dentro do gênero *Newbya* (**figuras 11 e 12**). Era esperado que estas sequências fossem as primeiras obtidas para espécie, todavia, duas sequências de *Achlya oblongata* estão disponíveis no GenBank (sequências DQ324365 e LC149928), ambas inseridas no estudo de Lau *et al.* (2018), os quais alegam identificar a espécie parasitando o peixe robalo asiático. De acordo com a análise apresentada por estes autores, as sequências pertencem à família Achlyaceae, com aproximação para *Achlya bissexualis*, *A. recurva* e *A. primoachlya*. Considerando o estudo morfológico detalhado dos espécimes aqui identificados, bem como a ausência de *N. oblongata* nos estudos de Spencer *et al.* (2002), além do posicionamento filogenético das sequências obtidas neste estudo, atestamos que a espécie pertence ao gênero *Newbya*, sendo sequenciada e inserida em análises filogenéticas pela primeira vez.

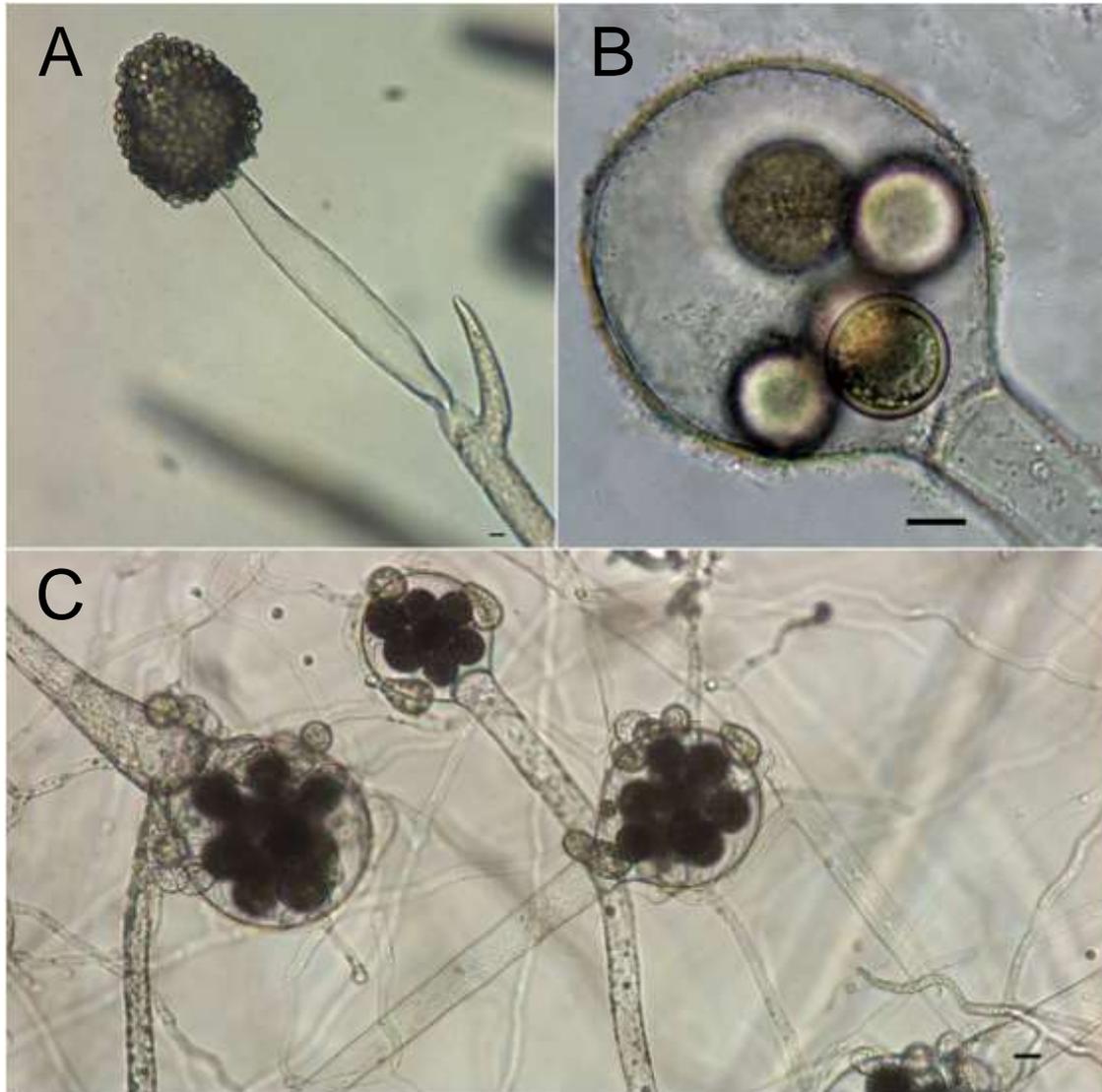


Figura 15. *Newbya oblongata*. **A** – Zoosporângios com descarga dos zoósporos primários aclióide. **B** – Oogônio com oósporo subcêntrico, não preenchendo todo o oogônio. **C** – Oogônios com oosferas e vários anterídios atracando os oogônios. Barra: 10 µm

5.4.1.3. Família Verrucalvaceae

Dentro da família Verrucalvaceae, seis táxons foram registrados, com quatro espécies identificadas dentro dos gêneros *Aphanomyces* e *Plectospira*. O gênero *Aphanomyces* foi representado por três espécies, *A. laevis*, *A. stellatus*, e uma espécie nova para ciência, *A. brasiliensis* (Pires-Zottarelli *et al.* 2019). Diéguez-Uribeondo *et al.* (2009) estudaram este gênero, observando a divisão filogenética do grupo em três

linhagens, sendo uma que compreende todas as espécies parasitas de animais, uma segunda que engloba os saprotróficos/opportunistas, e uma terceira que inclui apenas as espécies parasitas de plantas. Sequências obtidas neste estudo, bem como de espécimes do GenBank para as regiões ITS e LSU rDNA (**tabela 7**), foram incluídas na nossa análise concatenada (**figura 16**), o qual apresentou a formação dos três agrupamentos. Dentro do agrupamento que engloba os parasitas de animais estão posicionadas as nossas sequências de *Aphanomyces stellatus*, no entanto, neste estudo, os espécimes foram registrados apenas como sapróbios em amostras de água, com ocorrência nos tanques de cultivo, bem como nas amostras das entradas e saídas dos sistemas e água dos alevinos (**tabela 3**). Concordando com a posição no agrupamento dos parasitas de animais, esta espécie foi registrada em ovos de truta (Czeczuga *et al.* 2015a, b), bem como causando infecção em diferentes espécies peixes (Obgonna & Alabi 1991), sendo esta a espécie tipo do gênero, tendo como principais características oogônios com ornamentações papiladas e tuberculadas, bem como anterídios díclinos (Scott 1961).

A nova espécie registrada, *Aphanomyces brasiliensis*, a qual ocorreu como sapróbia em amostras de água na entrada e saída do sistema da UPD (**tabela 3**), está posicionada no agrupamento da linhagem dos saprotróficos/opportunistas (**figura 16**). Neste estudo os espécimes não apresentaram estruturas sexuais, sendo esta identificação uma parceria, com estudo conduzido na Unidade de Conservação Juréia-Itatins (São Paulo), sob responsabilidade da Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli (projeto FAPESP 2016/11146-4). Os espécimes obtidos nesta parceria, os quais foram isolados de amostras de solo, permitiram observar as estruturas sexuais (**figura 17**), com aproximação comprovada mediante análise filogenética. Recentemente, a espécie foi registrada colonizando ovos de peixe-zebra em incubatórios do Instituto de Pesca (IP),

sendo utilizado em testes de inibição do crescimento micelial para diferentes produtos químicos, entre eles, o uso do bronopol (Ferreira *et al.* 2021).

Tabela 7. Táxons, número em coleção e de acesso no GenBank de espécies de Verrucalvaceae utilizadas na análise concatenada das regiões ITS e LSU do rDNA. – : dados ausentes. N/A: dados não disponíveis. Em negrito, sequências obtidas no presente estudo. *Saprolegnia ferax* foi utilizado como grupo externo

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Aphanomyces astaci</i>	SAP333	FM999240	–
<i>Aphanomyces astaci</i>	SAP334	FM999241	–
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	CCIBt4359	MK513785	N/A
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	CPZ14	MK513786	MK546600
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	CCIBt4545	MK513787	MK546601
<i>Aphanomyces cladogamus</i>	CBS 10829	HQ643113	HQ665056
<i>Aphanomyces cladogamus</i>	CCIBt 3854	KT935285	KT935289
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	SAP346	FM999210	–
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	SAP345	FM999209	–
<i>Aphanomyces euteiches</i>	CBS 15473	HQ643119	HQ665129
<i>Aphanomyces euteiches</i>	CBS 15673	HQ643117	HQ665132
<i>Aphanomyces frigidophilus</i>	EU443838	EU443838	–
<i>Aphanomyces frigidophilus</i>	SAP472	FM992370	–
<i>Aphanomyces frigidophilus</i>	NJM9500	AY647192	–
<i>Aphanomyces helicoides</i>	CPZ100	MK513782	–
<i>Aphanomyces helicoides</i>	CPZ16	N/A	–
<i>Aphanomyces helicoides</i>	CCIBt3987	KR063218	KR063217
<i>Aphanomyces invadans</i>	NJM9701	EU422990	–
<i>Aphanomyces invadans</i>	SAP308	FM999229	–
<i>Aphanomyces invadans</i>	SAP307	FM999230	–
<i>Aphanomyces invadans</i>	SAP307	FM999230	–
<i>Aphanomyces izumoensis</i>	NJM0906	AB533304	–
<i>Aphanomyces izumoensis</i>	NJM0905	AB533303	–
<i>Aphanomyces izumoensis</i>	NJM0907	AB533305	–
<i>Aphanomyces laevis</i>	CCIBt 4070	KP006463	KP006453
<i>Aphanomyces laevis</i>	CCIBt4349	N/A	–
<i>Aphanomyces laevis</i>	CBS 127282	HQ111469	HQ395650
<i>Aphanomyces laevis</i>	CCIBt4662	N/A	N/A
<i>Aphanomyces piscicida</i>	NJM0003	AY455774	–
<i>Aphanomyces raphani</i>	CCIBt4409	MK513783	MK546598
<i>Aphanomyces repetans</i>	LK9	EU477367.	GQ152606
<i>Aphanomyces salsuginosus</i>	NJM0805	AB510352	–
<i>Aphanomyces salsuginosus</i>	NJM0804	AB510351	–
<i>Aphanomyces salsuginosus</i>	NJM0802	AB510349	–
<i>Aphanomyces sinensis</i>	TCCMYA4825	JQ070116	JQ070142
<i>Aphanomyces sinensis</i>	NJM0901	AB531974	–
<i>Aphanomyces shimanensis</i>	NJM0912	AB533292	–

Tabela 7. Continuação

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Aphanomyces shimanensis</i>	NJM0910	AB533291	–
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4249	N/A	N/A
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt3994	KP006462	KP006454
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt4305	MK513784	N/A
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CPZ15	N/A	N/A
<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>	CCIBt4107	KT935286	KT935291
<i>Phragmosporangium uniseriatum</i>	CCIBt 3986	KT213554	KT935290
<i>Plectospira gemmifera</i>	GHJ01	KX084705	KX084707
<i>Plectospira myriandra</i>	SCP9	N/A	N/A
<i>Plectospira myriandra</i>	CCIBt4674	N/A	N/A
<i>Plectospira myriandra</i>	CCIBt4664	N/A	N/A
<i>Plectospira myriandra</i>	CCIBt 3992	KR063220	KR063219
<i>Plectospira myriandra</i>	CCIBt3372	KT935288	KX353796
<i>Plectospira myriandra</i>	SCP90	N/A	N/A
<i>Plectospira myriandra</i>	CBS52387	HQ643402	–
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4681	N/A	N/A
<i>Saprolegnia ferax</i>	CCIBt4099	KT964708	KT964705

Também presente no agrupamento da linhagem dos parasitas saprotróficos/opportunistas, *A. laevis* foi registrado no presente estudo como sapróbio em amostras de água dos sistemas, inclusive na água que banha os ovos, mas ausente em ovos e peixes mortos (**tabela 3**). Na literatura há relatos da espécie em ovos de truta arco-íris (Chien 1980, Czczuga *et al.* 2015a), bem como causando infecção em diferentes espécies de peixes (Ogbonna & Alabi 1991, Willoughby 2003, Sarowar *et al.* 2014). Embora *A. brasiliensis* e *A. laevis* tenham sido registrados como sapróbios neste estudo, as espécies são citadas como presentes em ovos e peixes (Ferreira *et al.* 2021, Chien 1980, Ogbonna & Alabi 1991, Willoughby 2003, Sarowar *et al.* 2014, Czczuga *et al.* 2015a), sendo então justificável o posicionamento das mesmas na linhagem dos saprotróficos/opportunistas.

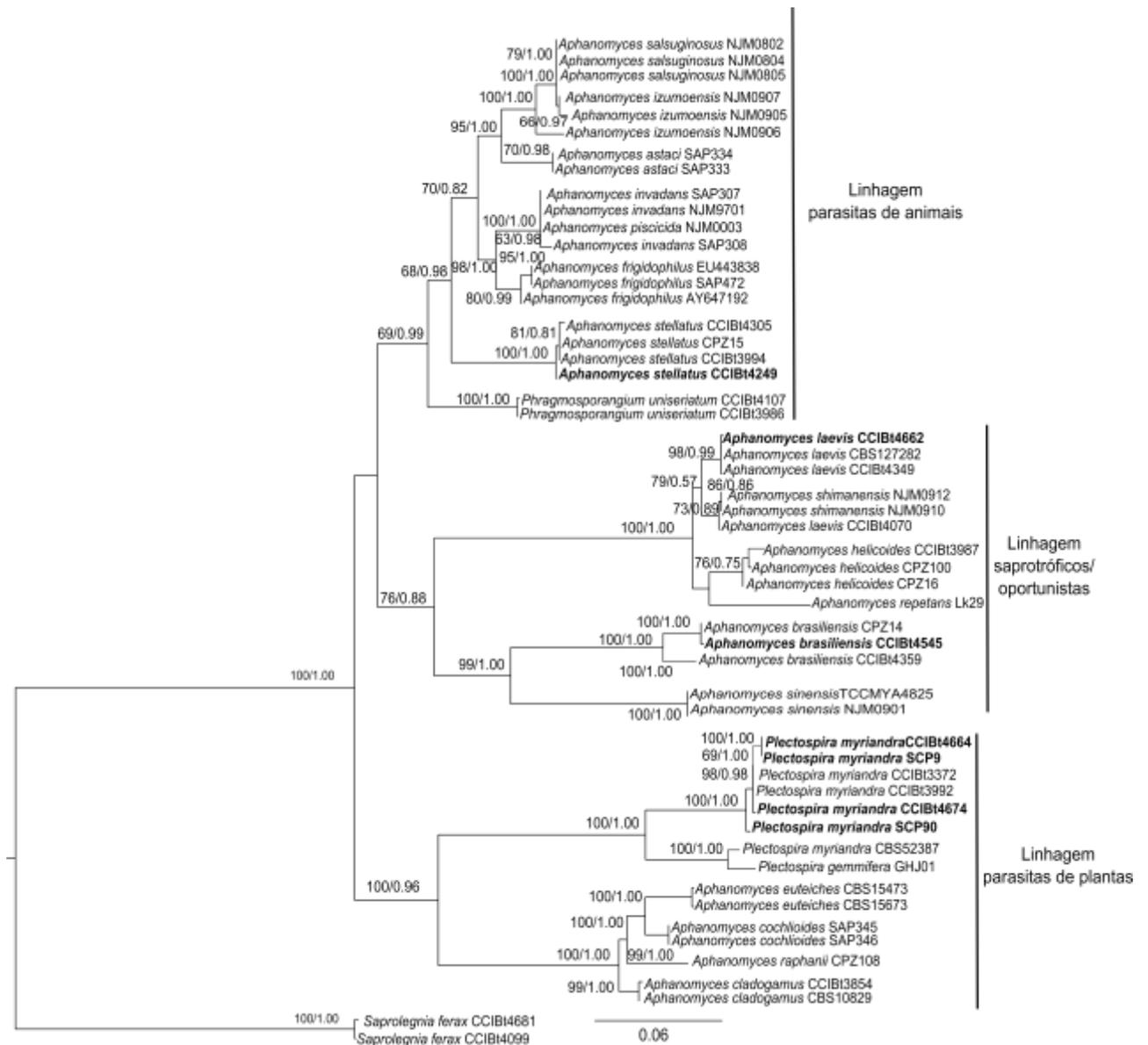


Figura 16. Análise filogenética de máxima verossimilhança de Verrucalveaceae *sensu* Beakes *et al.* (2014), com seqüências concatenadas das regiões ITS e LSU do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior). Apenas valores maiores que 50% são indicados numericamente e aqueles abaixo de 50% são marcados com (-). As barras de escala representam o número médio de substituições por sitio. As seqüências deste estudo são indicadas em negrito.

Presente no agrupamento das espécies de *Aphanomyces* correspondentes à linhagem dos parasitas de plantas, estão posicionadas as seqüências obtidas para *Plectospora myriandra*, com proximidade com as disponíveis no GenBank (**figura 16**).

O posicionamento na linhagem dos parasitas de plantas está de acordo com a literatura

(Drechsler 1927, 1953), conforme já mencionado. A espécie é caracterizada por formação de zoosporângios lobulados e oogônios com pedúnculos curtos e oósporos amarelados (Drechsler 1927).

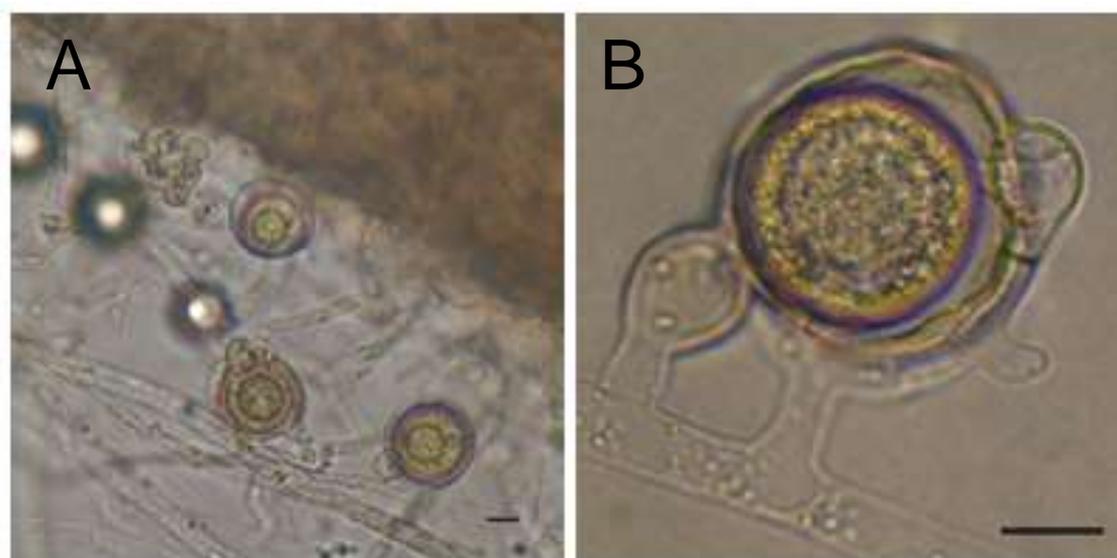


Figura 17. *Aphanomyces brasiliensis*. **A** – Zoósporos e oogônios em ecdise de cobra. **B** – Oogônio com oósporo, anterídios andrógino e monóclínico. Barra: 10 µm. Fotos: Carmen L. A. Pires-Zottarelli

5.4.2. Peronosporales *s.l.* nas truticulturas estudadas

5.4.2.1. Família Peronosporaceae *s.l.*

Dentro da família Peronosporaceae *s.l.*, o gênero *Phytopythium* foi o único registrado no presente estudo. Este gênero foi descrito por Bala *et al.* (2010), para incluir espécies que anteriormente pertenciam ao gênero *Pythium* classificados dentro do clado K (Levesque & de Cock 2004), cujas características morfológicas são consideradas intermediárias entre os gêneros *Phytophthora*, pela semelhança no tipo de zoosporângios, e o gênero *Pythium*, considerando que ambos tem o mesmo tipo de liberação dos zoósporos. Além disso, *Phytopythium* como um novo gênero foi

comprovado também por resultados da análise filogenética da região LSU (Bala *et al.* 2010), sendo posteriormente comprovado por meio das regiões ITS do rDNA e COI do mDNA (de Cock *et al.* 2015). No presente estudo identificamos *Pp. litorale* (**figura 18**), sendo esta primeira citação para o Brasil, com a elaboração de um artigo, o qual foi submetido para a revista FUSE - Fungal Systematic and Evolution (**anexo 2**). Os espécimes foram registrados como sapróbios em amostras de água nas saídas dos sistemas e nos tanques de cultivo na UP (**tabela 3**). Os estudos morfológicos não permitiram observar as estruturas sexuais da espécie, o que ocorreu também na descrição original (Nechwatal & Mengden 2006), com ocorrência em áreas costeiras da Alemanha, bem como os subsequentes registros da espécie na África do Sul, Irã e Coreia do Sul (McLeod *et al.* 2009, Bouket *et al.* 2016, Nam & Choi 2019). Sequências de espécimes obtidos neste estudo, também do GenBank para as regiões ITS e LSU rDNA (**tabela 8**) foram incluídas na análise concatenada (**figura 19**), confirmando a identificação de *Pp. litorale*. A espécie é relacionada com *Pp. citricium* e *Pp. delawarensis* agrupados no Clado I, juntamente com a espécie tipo do gênero, *Pp. sindhum*. Recentemente, Dervis *et al.* (2020) registraram a formação de estruturas sexuais em espécimes de *Pp. litorale*, isolados como patógeno de plátanos (*Platanus orientalis* L.) na Turquia. A análise filogenética apresentada por estes autores confirmam a identificação da espécie, sendo suas sequências inseridas também no presente estudo (sequências Dyrbkr01 e Dyrbkr02, **figura 19**). Não há registros de *Pp. litorale* em pisciculturas no mundo, contudo, a espécie tem sido apontada como um importante patógeno de plantas para diferentes espécies cultiváveis (Tkaczyk 2020).

Tabela 8. Táxons, número em coleção e de acesso no GenBank de espécies de *Phytopythium* utilizadas na análise concatenada das regiões ITS e LSU rDNA. – : dados ausentes. N/A: dados não disponíveis. Em negrito, sequências obtidas no presente estudo. *Pythium takayamanum* foi utilizado como agrupamento externo

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Phytopythium amazonianum</i>	WPC8243B519	GU258937	–
<i>Phytopythium amazonianum</i>	WPC8239B1845	GU258624	–
<i>Phytopythium boreale</i>	CBS55188	AB725879	HQ665261
<i>Phytopythium carbonicum</i>	CBS29237	AB690620	–
<i>Phytopythium carbonicum</i>	CBS112544	AB725876	AB996605
<i>Phytopythium chamaehyphon</i>	CPZ68	MT620967	MT612335
<i>Phytopythium chamaehyphon</i>	CCIBt4338	MT620968	MT612336
<i>Phytopythium chamaehyphon</i>	CCIBt4407	MT620969	MT612337
<i>Phytopythium chamaehyphon</i>	CBS25930	AB690609	HQ665177
<i>Phytopythium chamaehyphon</i>	PPRI8625	FJ415975	–
<i>Phytopythium citrinum</i>	S-12	AY197328	AB948195
<i>Phytopythium curcubitacearum</i>	CBS74896	AB725877	AB690598
<i>Phytopythium delawarensense</i>	382B	AB725875	AB690591
<i>Phytopythium dogmae</i>	USTCMS4101	MF353170	MF373431
<i>Phytopythium fagopyri</i>	HonMa	AB690615	AB690588
<i>Phytopythium fagopyri</i>	FP1	AB690621	AB690599
<i>Phytopythium fagopyri</i>	CBS29335	AB690617	AB690590
<i>Phytopythium helicoides</i>	CBS28631	AB725878	MF375637
<i>Phytopythium helicoides</i>	CCIBt4103	KR092138	–
<i>Phytopythium helicoides</i>	CCIBt4104	KR092137	–
<i>Phytopythium iriomotense</i>	GUCC0025	AB690622	AB690600
<i>Phytopythium iriomotense</i>	GUCC7020	AB690629	AB690607
<i>Phytopythium kandeliae</i>	CBS11191	HQ643134	HQ665065
<i>Phytopythium kandeliae</i>	AJM26	KJ399962	KJ399965
<i>Phytopythium leanoi</i>	USTCMS4102	MF353169	MF373430
<i>Phytopythium leanoi</i>	CBS11391	MF355474	KJ399963
<i>Phytopythium litorale</i>	GUCC7167	AB690612	AB690583
<i>Phytopythium litorale</i>	Dyrbkr01	MN203107	MN197634
<i>Phytopythium litorale</i>	Dyrbkr02	MN203108	MN197635
<i>Phytopythium litorale</i>	CBS118360	HQ643386	HQ665082
<i>Phytopythium litorale</i>	CCIBt4659	MT620970	MT612338
<i>Phytopythium litorale</i>	SCP82	MT620972	MT612340
<i>Phytopythium megacarpum</i>	CBS112.351	AB725881	HQ665067
<i>Phytopythium mercuriale</i>	CBS112443	AB725882	KF853236
<i>Phytopythium mirpureense</i>	CBS124524	KJ831614	–
<i>Phytopythium montanum</i>	CBS111349	AB725883	HQ665064
<i>Phytopythium montanum</i>	ADC9762	HQ643391	–
<i>Phytopythium nanginjense</i>	Chen216	MF459636	–
<i>Phytopythium nanginjense</i>	Chen218	MF459635	–
<i>Phytopythium oedochilum</i>	CBS29237	AB690619	HQ665191
<i>Phytopythium oedochilum</i>	CBS73894	HQ643394	–
<i>Phytopythium ostracodes</i>	CBS76873	AB108022	HQ665295
<i>Phytopythium palingenes</i>	CCIBt3981	KR092139	KR092143

Tabela 8. Continuação

Táxon	Código	ITS	LSU
<i>Phytopythium palingenes</i>	CCIBt4428	MT620973	MT612341
<i>Phytopythium palingenes</i>	CCIBt4397	MT620974	MT612342
<i>Phytopythium sindhum</i>	CBS124518	HM244825	–
<i>Phytopythium sindhum</i>	JKI	KJ755089	–
<i>Phytopythium vexans</i>	CBS11980	HQ643400	–
<i>Phytopythium vexans</i>	CCIBt4101	KR092141	KR092144
<i>Phytopythium vexans</i>	CCIBt4398	MT620975	MT612343
<i>Phytopythium vexans</i>	CCIBt4383	MT620976	MT612344
<i>Pythium takayamanum</i>	CBS122492	HQ643853	HQ665094
<i>Pythium takayamanum</i>	CCIBt4040	KM058758	KM058755

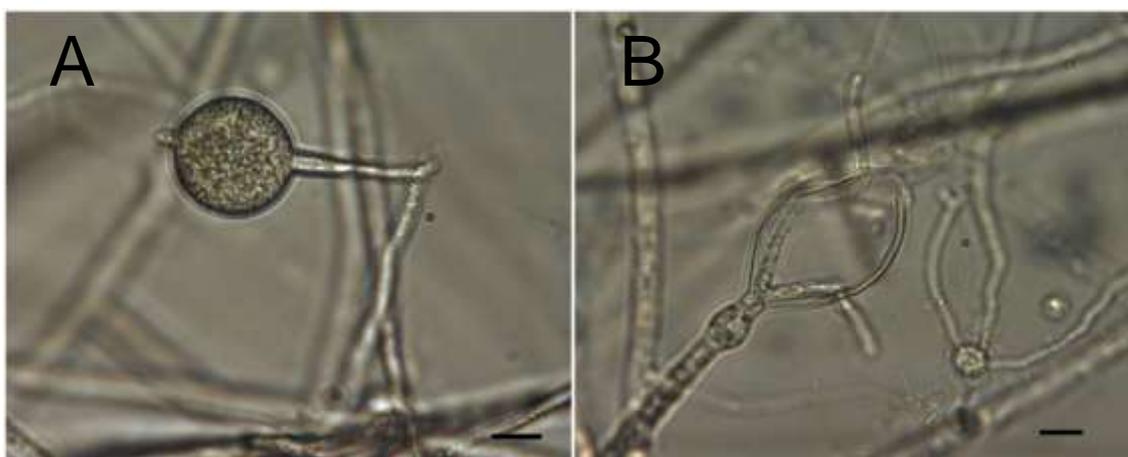


Figura 18. *Phytopythium litorale*. **A** – Zoosporângio esférico. **B** – Proliferação interna do zoosporângio. Barra: 10 µm

5.4.2.2. Família Pythiaceae *s.l*

Dentro da família Pythiaceae *s.l.* dois gêneros foram registrados, *Pythiogeton* e *Pythium*, com cinco táxons identificados. O gênero *Pythiogeton* foi representado por uma espécie, *Py. abundans* (**figura 20**), sendo esta primeira citação para o Brasil. Este gênero tem como principal característica o crescimento dos zoosporângios em ângulo de 90 graus na hifa, contudo, os estudos taxonômicos são considerados escassos, pela dificuldade de isolamento e de registros (Sparrow 1960, Jee *et al.* 2000, Ann *et al.* 2006, Rocha *et al.* 2014), sobretudo com relação aos dados moleculares (Huang *et al.* 2013).

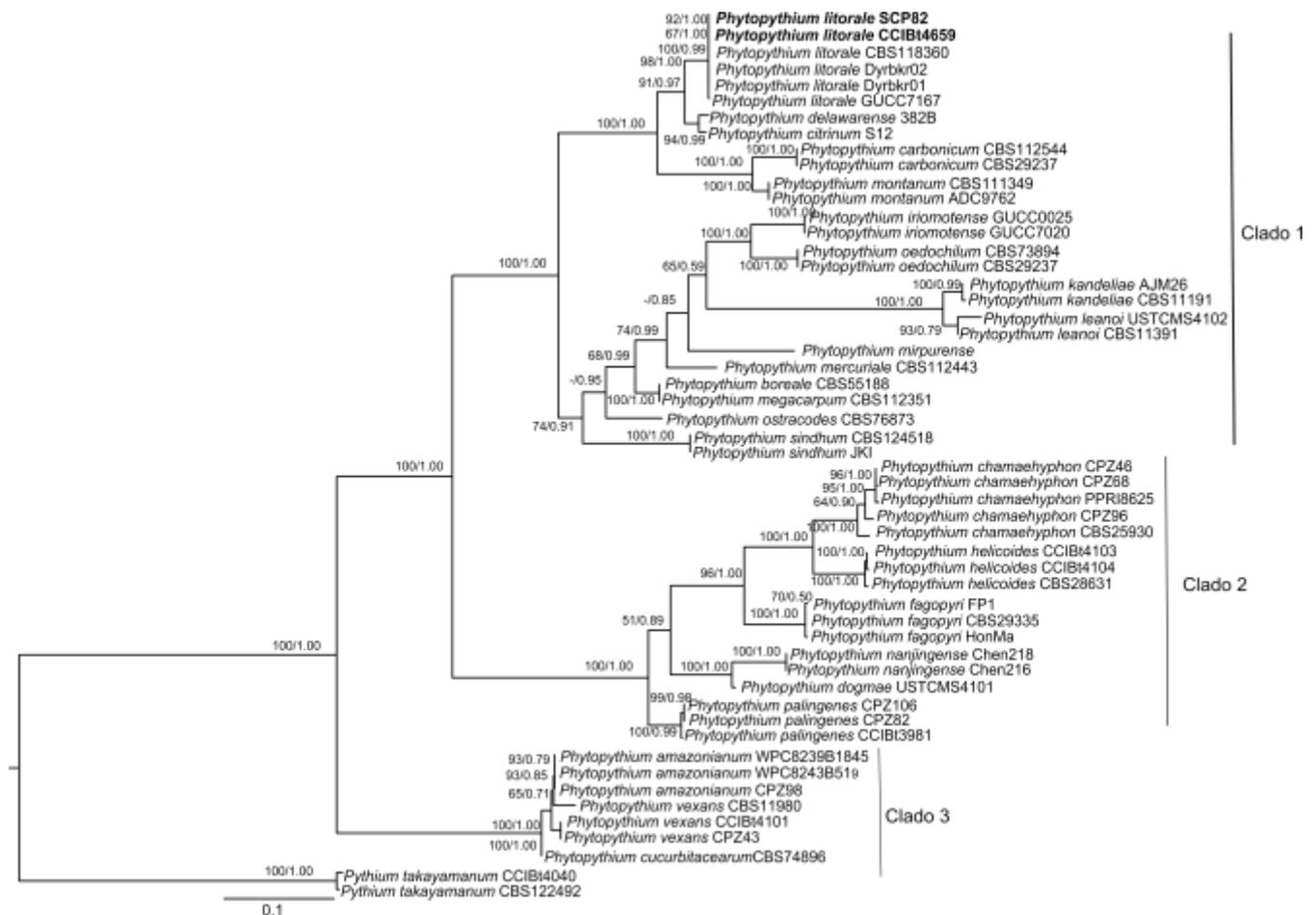


Figura 19. Análise filogenética de máxima verossimilhança do gênero *Phytophthium* com sequências concatenadas das regiões ITS e LSU do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior), com suportes < 50% indicados com (-). Os clados que não foram recuperados na árvore bayesiana são indicados com (0). A barra de escala indica o número médio de substituições por sítio. As sequências deste estudo são indicadas em negrito.

De acordo com o levantamento de Rocha *et al.* (2014, atualizado), no Brasil quatro representantes de *Pythiogeton* foram registrados, sendo *Py. ramosum* a única espécie registrada no estado de São Paulo, coletada como sapróbia em amostras de água e solo na Represa no Guarapiranga por Rocha & Pires-Zottarelli (2002). Neste estudo, *Py. abundans* foi registrada em amostras de água coletadas das entradas e saídas dos sistemas e nos tanques de cultivo, bem como em peixe morto, como resultado da raspagem na epiderme do animal (**tabela 3**). De acordo com a descrição original, a

espécie tem como principal característica a abundância na formação de zoosporângios (**figura 20**), com formatos globosos e ovoides, com tamanhos variando de 35–50 × 25–45 µm, o que é considerado grande para o gênero (Huang *et al.* 2013). Pela falta de sequências disponíveis no GenBank, neste estudo apenas a região ITS foi utilizada na análise filogenética (**figura 21**), confirmando o posicionamento e identificação dos espécimes obtidos. Por outro lado, a obtenção da região LSU, bem como a disponibilização no banco de dados do GenBank, irá contribuir para o aumento de dados gênicos sobre o gênero, podendo auxiliar em estudos futuros.

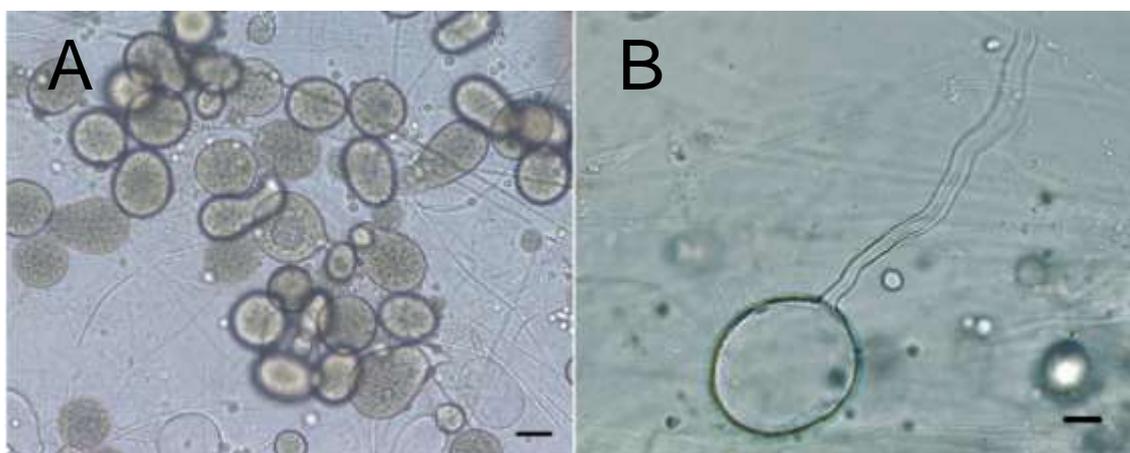


Figura 20. *Pythiogeton abundans*. **A** – Zoosporângios. **B** – Zoosporângio vazio com longo tubo de liberação. Barra: 10 µm

Ainda dentro da família Pythiaceae *s.l.*, o gênero *Pythium* teve o maior número de representantes, com a identificação de três espécies: *P. segnitium*, *P. undulatum* e *Pythium* pertencente ao grupo F (espécies caracterizadas pela formação de zoosporângios filamentosos não inflados), de acordo com a classificação em Plaats-Niterink (1981). Estudos mostraram que o gênero *Pythium* é um agrupamento polifilético, com a divisão em 11 clados, caracterizados por definições morfológicas que refletem o agrupamento (Levesqué & de Cock 2004, Uzuhashi *et al.* 2010, Robideau *et al.* 2011, Beakes *et al.* 2014). A análise concatenada para as regiões ITS e LSU mostra

que as espécies de *Pythium* do grupo F estão posicionadas dentro do clado B, com aproximação com as espécies *P. coloratum*, *P. diclinum*, *P. lutarium* e *P. dissotocum* (**tabela 9, figura 22**), com alto valor de bootstrap e probabilidade posterior (bs= 98, pp= 1.00). A estreita relação entre estas espécies dentro do clado B já é conhecida (Lévesque & de Cock 2004, Robideau *et al.* 2011, Gonçalves *et al.* 2016), bem como a necessidade da inserção de outros genes nas análises, como uma tentativa de esclarecer a proximidade entre estas espécies, considerando também a possibilidade de uma possível sinonimização das mesmas pelas semelhanças morfológicas que apresentam. As espécies de *Pythium* agrupada no grupo F foram os mais abundantes neste estudo (UP= 27, UPD= 12), presentes em praticamente todos os sistemas analisados, sapróbios em amostras de água, inclusive em peixe morto e ovos de truta arco-íris (**tabela 3**). Uma vez que nossa análise concatenada não pode definir as espécies, optou-se por manter o agrupamento definido em Plaats-Niterink (1981) como pertencentes ao grupo F.

Dois representantes de *Pythium segnitium* foram sequenciados, dos 15 registrados nos sistemas como sapróbios em amostras de água nos tanques de cultivo, bem como em ovo de truta arco-íris (**tabela 3**), estando posicionados dentro do clado E (**figura 22**), com proximidade com as outras sequências da espécie do GenBank. De acordo com Lévesque & de Cock (2004), este clado é formado por espécies com zoosporângios esféricos e globosos, podendo aparecer proliferação interna ou não. Na descrição original não foi observada reprodução assexuada em *P. segnitium* (Paul 2002), no entanto, nós observamos a formação de zoosporângios terminais e intercalares, frequentemente esféricos, de 16,0–35,0 µm diâmetro, com alguns subglobosos, concordando com Gonçalves *et al.* (2016), os quais observaram pela primeira vez a reprodução assexuada da espécie. Este é o primeiro registro da espécie em truticultura.

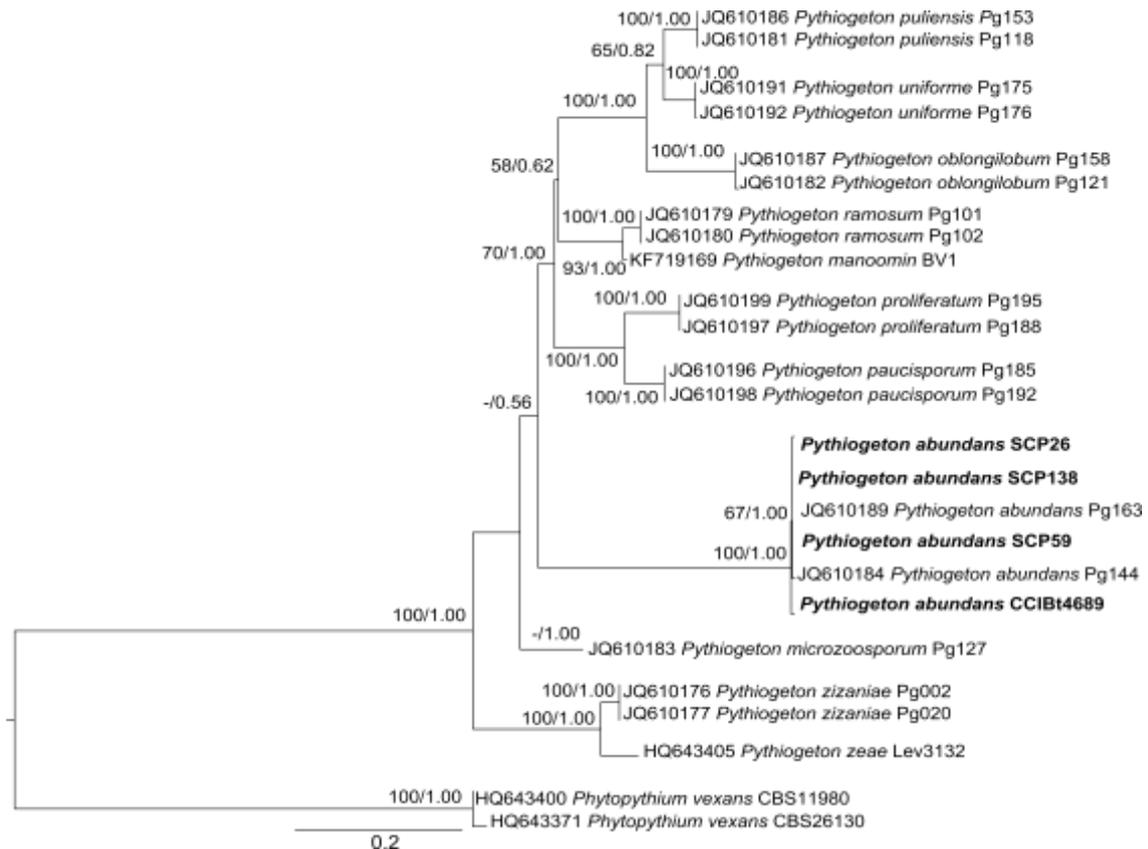


Figura 21. Análise filogenética de máxima verossimilhança (ML) de *Pythiogeton* com sequências da região ITS do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior). Apenas valores maiores que 50% são indicados numericamente e aqueles abaixo de 50% são marcados com (-). As barras de escala representam o número médio de substituições por sítio. As sequências deste estudo são indicadas em negrito.

Representantes de *Pythium undulatum* foram registrados em amostras de água dos sistemas de cultivo, nas entradas e saídas, bem como nos tanques de cultivo (**tabela 3**). Sati (1991) registrou *P. undulatum* pela primeira vez como patógeno de diferentes espécies de peixe, e Mastan & Ahmad (2018) testaram sua virulência em carpas, no entanto, não se tem registro da espécie em truticultura. A análise filogenética mostra nossas sequências intimamente relacionadas com sequências de *P. undulatum* do GenBank, as quais se posicionam no clado H (**figura 22**). O clado H é caracterizado por espécies com morfologia distinta, tais como a formação de zoosporângios grandes quando comparado com outras espécies do gênero (Levésque & de Cock 2004). As

principais características de *P. undulatum* incluem a formação de zoosporângios elipsoidais, com tamanhos variando de 30–77,5 × 25–30 µm, apresentando proliferação interna e formação de clamidósporos (Plaats-Niterink 1981, Gomes & Pires-Zottarelli 2008). Dick (1989) colocou *P. undulatum* como sinonímia de *Phytophthora undulata*, com base nas características morfológicas da espécie. Recente estudo de Yang *et al.* (2017), com base em análises filogenéticas para o gênero *Phytophthora*, mostram que esta espécie é distante do gênero *Phytophthora* e, por este motivo, a sinonimização não foi aceita no presente estudo.

Tabela 9. Táxons, número em coleção e de acesso no GenBank de espécies de *Pythium* utilizadas na análise concatenada para as regiões ITS e LSU rDNA. – : dados ausentes. N/A: dados não disponíveis. Em negrito, sequências obtidas no presente estudo. *Phytophythium vexans* foi utilizado como agrupamento externo

Táxon	Clado	Código	ITS	LSU
<i>Phytophythium vexans</i>	K	CBS11980	HQ643400	–
<i>Phytophythium vexans</i>	K	CCIBt4101	KR092141	KR092144
<i>Pythium acrogynum</i>	E	CBS54988	HQ643414	–
<i>Pythium anandrum</i>	H	CBS28531	HQ643435	–
<i>Pythium angustatum</i>	B	CBS16968	HQ643740	–
<i>Pythium apieroticum</i>	B	CBS77281	HQ643444	–
<i>Pythium aquatile</i>	B	CBS21580	HQ643445	–
<i>Pythium aquatile</i>	B	BR654	HQ643446	–
<i>Pythium bifforme</i>	B	UZ00796	KJ995584	KJ995601
<i>Pythium bifforme</i>	B	UZ00798	KJ995585	KJ995602
<i>Pythium catenulatum</i>	B	UZ264	AB468766	AB468702
<i>Pythium catenulatum</i>	B	CBS84268	HQ643494	–
<i>Pythium coloratum</i>	B	BR908	HQ643500	–
<i>Pythium coloratum</i>	B	CBS15464	HQ643501	–
<i>Pythium diclinum</i>	B	CBS52674	HQ643523	–
<i>Pythium diclinum</i>	B	CBS66479	HQ643524	–
<i>Pythium dimorphum</i>	H	773B	EU240081	–
<i>Pythium dimorphum</i>	H	833 ^a	EU240073	–
<i>Pythium dimorphum</i>	H	CBS40672	HQ643525	–
<i>Pythium dissotocum</i>	B	UZ159	AB468767	AB468703
<i>Pythium dissotocum</i>	B	CBS16668	HQ643528	–
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP23	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP24	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP33	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP37	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	CCIBt4675	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP34	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP38	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	CCIBt4673	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	CCIBt4684	N/A	N/A

Tabela 9. Continuação

Táxon	Clado	Código	ITS	LSU
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP32	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	CCIBt4672	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP65	N/A	N/A
<i>Pythium</i> do grupo F	B	SCP27	N/A	N/A
<i>Pythium echinulatum</i>	E	CBS28164	HQ643531	–
<i>Pythium echinulatum</i>	E	PPRI8602	FJ415921	–
<i>Pythium graminicola</i>	B	CBS32762	AY598625	HQ665211
<i>Pythium graminicola</i>	B	UQ2069	AF330192	–
<i>Pythium helicandrum</i>	H	CCIBt3990	KT336500	KT852987
<i>Pythium helicandrum</i>	H	CBS84568	HQ643549	–
<i>Pythium inflatum</i>	B	VMNSO2363	KU210969	–
<i>Pythium inflatum</i>	B	CBS16868	AY598626	HQ665140
<i>Pythium kashimirensense</i>	B	CBS122908	–	HQ665118
<i>Pythium longicarpum</i>	B	F13265	HM747029	–
<i>Pythium lutarium</i>	B	CBS22288	HQ643682	–
<i>Pythium lutarium</i>	B	CILSO2420	KU210603	–
<i>Pythium middletonii</i>	E	CCIBt4126	KX090906	–
<i>Pythium middletonii</i>	E	CBS52874	HQ643694	–
<i>Pythium monospermum</i>	B	BR1031	HQ643699	–
<i>Pythium monospermum</i>	B	CBS15873	HQ643697	–
<i>Pythium myriotylum</i>	B	MIE2018072001	LC518894	–
<i>Pythium myriotylum</i>	B	MIE2018072401	LC518895	–
<i>Pythium oopapillum</i>	B	CCIBt4149	KT823952	–
<i>Pythium oopapillum</i>	B	CCIBt4098	KT823951	–
<i>Pythium oopapillum</i>	B	DAOMBR180	FJ655176	–
<i>Pythium perillum</i>	B	CBS16868		
<i>Pythium pleroticum</i>	E	Lev2114	HQ643747	–
<i>Pythium pleroticum</i>	E	CBS77681	HQ643748	–
<i>Pythium prolatrum</i>	H	CBS84568	HQ643754	–
<i>Pythium pyrilibum</i>	B	CBS15864	HQ643755	–
<i>Pythium rostratiformans</i>	E	UZ354	AB468773	AB468711
<i>Pythium rostratiformans</i>	E	OPU1440	AB468774	AB468712
<i>Pythium rostratiformans</i>	E	CBS115464	HQ643761	–
<i>Pythium rostratum</i>	E	CBS53374	HQ643767	–
<i>Pythium rostratum</i>	E	OPU1441	AB468775	AB468713
<i>Pythium schmitthenneri</i>	E	Pick1415	JF836870	–
<i>Pythium schmitthenneri</i>	E	CBS129726	KJ716862	–
<i>Pythium segnitium</i>	E	SCP21	N/A	N/A
<i>Pythium segnitium</i>	E	CCIBt4660	N/A	N/A
<i>Pythium segnitium</i>	E	CCIBT4102	KT823955	–
<i>Pythium segnitium</i>	E	CII44	AY149173	–
<i>Pythium segnitium</i>	E	F15171	MK026951	–
<i>Pythium segnitium</i>	E	CBS112354	HQ643772	–
<i>Pythium selbyi</i>	E	CBS129728	KJ716863	–
<i>Pythium torulosum</i>	B	UZ357	AB468780	AB468718
<i>Pythium torulosum</i>	B	CBS31633	HQ643859	–
<i>Pythium undulatum</i>	H	SCP7	N/A	N/A
<i>Pythium undulatum</i>	H	CCIBt4297	N/A	N/A
<i>Pythium undulatum</i>	H	Lev1232	HQ643947	–
<i>Pythium undulatum</i>	H	CBS31347	HQ643948	–

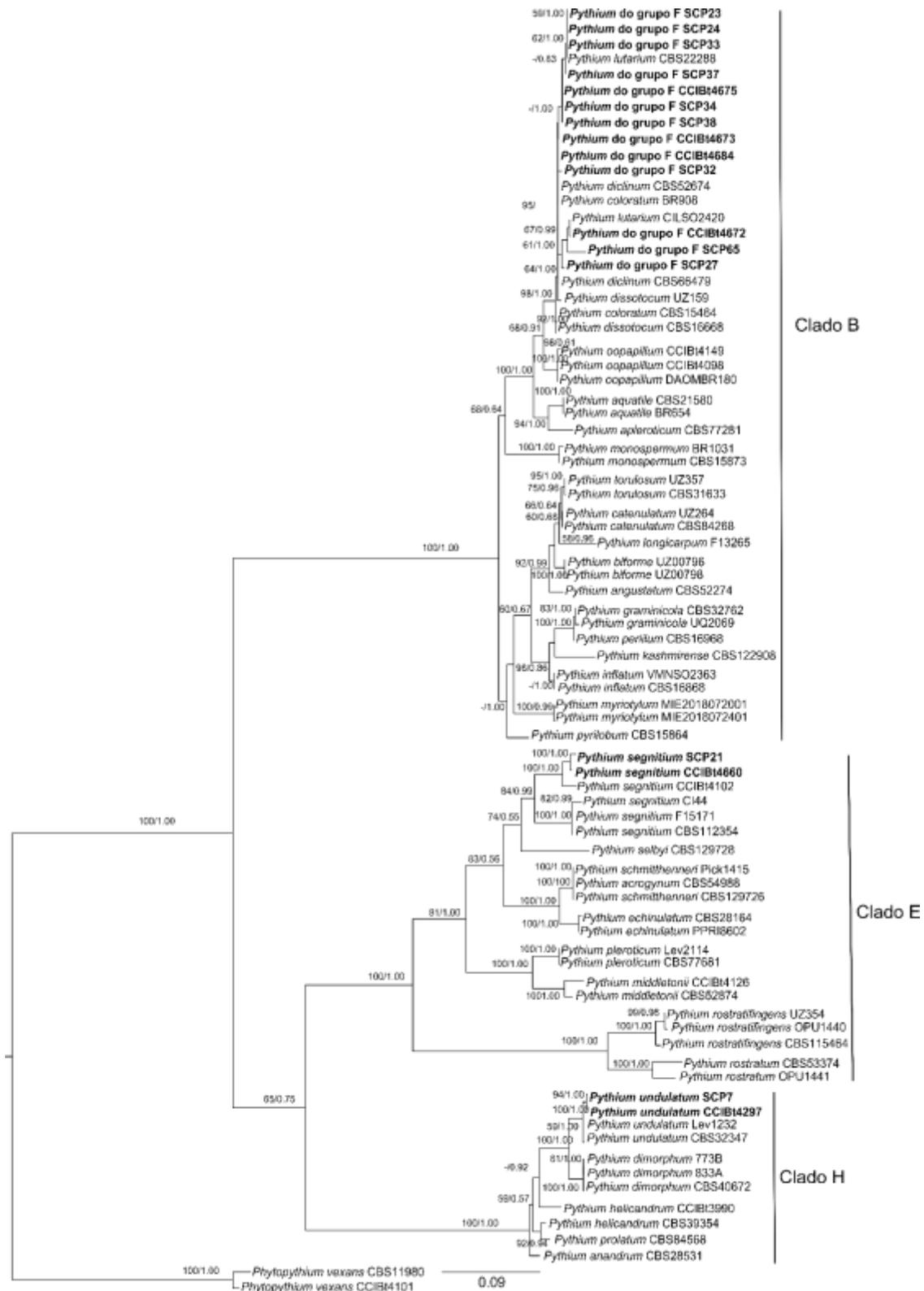


Figura 22. Análise filogenética de máxima verossimilhança (ML) do gênero *Pythium* com seqüências concatenadas das regiões ITS e LSU do rDNA. Os números nos ramos são valores de suporte de ML/BI (bootstrap e probabilidade posterior). Apenas valores maiores que 50% são indicados numericamente e aqueles abaixo de 50% são marcados

com (-). As barras de escala representam o número médio de substituições por sítio. As sequências deste estudo são indicadas em negrito.

5.4.3. Olpidiopsidales s.l. nas truticulturas estudadas

5.4.3.1. Família Olpidiopsidaceae s.l

Olpidiopsis é o único gênero pertencente à família Olpidiopsidaceae s.l., e foi representado neste estudo por 3 espécies, *O. achlyae*, *O. aphanomycis* e *O. saprolegniae* (**tabela 3**). Todas elas foram registradas parasitando espécies de oomicetos, sem sucesso na obtenção de cultivo e nos estudos moleculares. Para depósito em coleção, lâminas semipermanentes foram preparadas com um representante de cada espécie, as quais foram incorporadas ao Herbário SP. O gênero é estabelecido dentro do grupo dos oomicetos basais (Beakes & Thines 2017, Marano *et al.* 2017), comprovado por análises filogenéticas, com a maioria dos estudos realizados com espécies patógenas de animais marinhos (Sekimoto *et al.* 2009, Kim *et al.* 2014, Klochkova *et al.* 2016), enquanto apenas poucas espécies que ocorrem em água doce foram sequenciadas (Buaya *et al.* 2019, Buaya & Thines 2020). A morfologia do grupo é relativamente simples, composto por organismos holocárpicos, não septados, endoparasitas multinucleados, os quais apresentam uma ampla diversificação de hospedeiros, que inclui algas vermelhas e verdes, diatomáceas, dinoflagelados, fungos terrestres, angiospermas e também outros oomicetos (Sparrow 1960, Karling 1981, Sekimoto *et al.* 2009, Strittmatter *et al.* 2009, Rocha *et al.* 2018a, Badis *et al.* 2019). A diversificação dos hospedeiros dentro da ordem Saprolegniales foi amplamente testada por Shanor (1940), o qual observou grande especificidade no parasitismo, evidenciando características fisiológicas distintas em espécies morfologicamente próximas, o que fez

com que a taxonomia se estendesse a identificação do hospedeiro em alguns casos (Beakes & Thines 2017, Rocha *et al.* 2018a, Buaya *et al.* 2019). Este é o caso da espécie *Olpidiopsis achlyae* (SP512736), a qual foi registrada nas entradas dos sistemas, bem como em ovo de truta arco-íris, causando hipertrofia na célula do hospedeiro (**tabela 3**). Karling (1981) descreve a espécie parasitando *Achlya flagellata*, *A. americana* e *Achlya* sp. Neste estudo três espécimes foram registrados, parasitando *Achlya* sp. e *A. radiosa*, com este último hospedeiro apresentando estrutura sexuada quando parasitada, o que facilitou sua identificação. De forma oposta, os hospedeiros dos representantes identificados por *O. aphanomycis* (SP512737), os quais ocorreram em amostras de água das entradas, saídas e tanques de cultivo (**tabela 3**), não apresentaram estruturas sexuais quando parasitados. Karling (1981) descreve esta espécie parasitando *Aphanomyces laevis* e *A. cladogamus*, no entanto, devido às condições precárias dos três hospedeiros parasitados, com hipertrofia causada na célula do hospedeiro, não foi possível sua identificação. Para os representantes de *O. saprolegniae* (SP512738), espécie tipo do gênero, três espécimes foram registrados, ocorrendo nas amostras de água e ovos de truta. Os espécimes foram registrados em *Saprolegnia* sp. e *S. diclina*, com esta última identificação confirmada por meio de dados moleculares, após purificação. Karling (1981) descreve a espécie como parasita de várias espécies de *Saprolegnia*, incluindo *S. diclina*. Todas as espécies aqui identificadas foram anteriormente registradas no Brasil (Rocha *et al.* 2018a). Não foram encontrados registros de *O. achlyae* em pisciculturas e peixes, entretanto, Czczuga *et al.* (1996) registraram *O. aphanomycis* em ovos de truta

do ártico, bem como *O. saprolegniae* foi registrada em pele de piranhas carnívoras em uma lagoa da Polônia (Czeczuga *et al.* 2010).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do levantamento de espécies do filo Oomycota, foi verificado que estes organismos zoospóricos estão distribuídos por todo o sistema nas truticulturas estudadas, com algumas espécies sendo conhecidos patógenos de peixes, o que serve de alerta aos truticultores no Brasil. Além disso, os resultados apontaram ser a água o principal meio de dispersão destes organismos nos sistemas estudados, mostrando a importância do nosso esforço amostral. Embora não tenha havido diferença significativa entre as amostras, a maior abundância de oomicetos foi registrada em épocas mais frias do período de estudo, contudo a ausência de surtos de doenças por oomicetos nas truticulturas estudadas denota a importância da estabilidade dos fatores ambientais, periodicamente mensuradas pelos responsáveis, bem como da filtragem da água que entra nos sistemas.

Por meio de estudos morfológicos e/ou moleculares foi possível verificar uma relevante diversidade de oomicetos nas truticulturas estudadas, sendo a maioria das espécies pertencente à ordem Saprolegniales. Diferente do esperado, *Saprolegnia* não foi o gênero mais abundante, e sim o gênero *Achlya*, com as espécies *Achlya radiosa* e *A. caroliniana* como as mais abundantes. Dentre os trinta e três táxons registrados, vinte e três foram identificados em nível específico, todos primeiras citações para a cidade de Campos do Jordão. *Phytophythium litorale*, *Newbya oblongata* e *Pythiogeton abundans* são novas citações para o Brasil, bem como *Aphanomyces brasiliensis* uma nova espécie para a ciência e já publicada.

O estudo é inédito no Brasil, contribuindo para o conhecimento da diversidade de oomicetos em pisciculturas no país, permitindo compreender a dinâmica destes organismos nos sistemas. Os registros dos oomicetos ampliam o conhecimento das espécies no país, com o registro de novas citações e um novo táxon para a ciência. Além disso, amplia o número de informações moleculares destes organismos, por meio da disponibilização das sequências gênicas em bancos de dados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeli A, Baghaei F.** (2013) Production and Supply of Rainbow Trout in Iran and the World. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 5: 335–341.
- Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, Agathai S, Berneyj C, Brownk MW, Burkim F, Cardenasn P, Ivan Ckao C, Chistyakovap L, del Campoq J, Dunthornr M, Edwardsent B, Eglitu Y, Guillouv L, Hamplw V, Heissx AA, Hoppenrathy M, Jamesz TY, Karnkowskaa A, Karpovh S, Kimx E, Koliskoe M, Kudryavtsevh A, Lahrac DJG, Laraad E, Gallaf LL, Lynnag DH, Mannai DG, Massanaq R, Mitchellad EAD, Morrowal C, Parkam JS, Pawlowskian JW, Powellao MJ, Richterap DJ, Rueckertaq S, Shadwickar L, Shimanoas S, Spiegelar FW, Guifre Torruella G, Youssefau N, Zlatogurskyh V, Zhang Q.** (2018) Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4–119.
- Afzali SF, Hassan MD, Mutalib AR, AM, Sharifpour I. Sabri J.** (2013) Isolation and Identification of *Aphanomyces* Species from Natural Water Bodies and Fish Farms in Selangor, Malaysia. *Malaysian Applied Biology Journal*. 42: 1–11.
- Afzali SF, Hassan MD, Sharifpour I, Afsharnasab M, Shankar S.** (2015) Experimental infection of *Aphanomyces invadans* and susceptibility in seven species of tropical fish. *Veterinary World*. 8: 1038–1044.

- Ajagbe SO, Oyewole OO, Oyewumi RV, Ojubolamo MT, Ajagbe RO, Olawuyi OL.** (2018) Alternative Therapy for the Treatment of Saprolegniasis Disease of Fish: A Review. *International Journal of Applied Research and Technology*. 7: 39–47.
- AldermanDJ.** (1994) Control of oomycete pathogens in aquaculture. *In: Mueller, G.J.* (Ed.). *Salmon saprolegniasis*, U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration. Portland, pp 111–129.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M.** (1996) *Introductory Mycology* 4. Ed. New York: John Wiley & Sons, 869 p.
- Al-Hussini HS, Al-Rawahi AY, Al-Marhoon AA, Al-Abri SA, Al-Mahmooli IH, Al-Sadi AM, Velazhahan R.** (2019) Biological control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum* by using native antagonistic rhizobacteria isolated from Omani soil. *Journal of Plant Pathology* 101: 315–322.
- Alvarez F, Razquin B, Villena A, Lopez-Fierro P, Zapata A.** (1988) Alterations in the Peripheral lymphoid Organs and differential leukocyte counts in *Saprolegnia* infected brown trout, *Salmo trutta fario*. *Veterinary immunology and immunopathology* 18: 181–193.
- Amaral GF.** (2007) Análise do segmento de trutas: abordagens de cadeia produtiva e turismo rural. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, dissertação de mestrado, 118 pp.
- Ann PJ, Huang JH, Wang IT.** (2006) *Pythiogeton zizaniae*, a new species causing basal stalk rot of water bamboo in Taiwan. *Mycologia* 98: 116–120.
- Anuário Peixe BR.** (2020) Anuário da Peixe BR. (Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020>, com acesso em: 20 de janeiro de 2021).

- APTA** (2014) Cinquenta anos Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Campos do Jordão-Referência em pesquisa de trutas no Brasil. Edição comemorativa.
- Arismendi I, Penaluna BE, Gomez-Uchida Prinzio DD, Rodríguez-Olarte D, Carvajal-Vallejos FM, Mojica JI, Mazzoni R, Cussac V, Maldonado M, Caramaschi EP, Zeballos AJ, Villalba A, Van Damme PA, Córdova L, Iglesias-Rios R, Cañas-Rojas D, Cañas-Merino M, Benavente JN, Núñez-Flores M, Musleh SS, Savaria P.** (2019) Trout and Char of South America. *In*: Kershner J, Williams J, Gresswell R, Lobon-Cervia J, (eds.). Trout and Char of the World. Bethesda (MD): American Fisheries Society, pp 279–311.
- 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.
- Awal S, Campobasso M.** (2015) A study biofilm ecology, development and dynamics in a recirculating aquaculture system as a possible vector for fish disease. *Trends Peer-Reviewed Journal* 4: 29–41.
- Badis Y, Klochkova TA, Strittmatter M, Garvetto A, Murúa P, Sanderson JC, Gwang Hoon Kim GH, Gachon CMM.** (2019) Novel species of the oomycete *Olpidiopsis* potentially threaten European red algal cultivation. *Journal of Applied Phycology* 31: 1239–1250.
- Bala K, Robideau GP, Lévesque A, Cock AWAM, de Abad ZG, Lodhi AM, Shahzad S, Ghaffar A, Coffey MD.** (2010) *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau & Levesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & 370 Levesque, sp. nov. *Persoonia* 24:136–137.

- Baptista FR, Pires-Zottarelli CLA, Rocha M, Milanez AI.** (2004) The genus *Pythium* Pringshein from Brazilian cerrado areas, in the state of São Paulo, Brazil. *Revista brasileira de Botânica* 2: 281–290.
- Barbosa AS, Pereira RG, Rodrigues LA, Casaca JM, Valenti WC, Fabregat TEHP.** (2020) Economic analysis of family trout farming in Southern Brazil. *Aquaculture Internacional* 28: 2111–2120.
- Barone RSC, Lorenz EK, Sonoda DY, Cyrino JEP.** (2017) Fish and fishery products trade in Brazil, 2005 to 2015: A review of available data and trends. *Scientia Agricola* 74: 417–424.
- Bastide de la PY, Leung WL, Hintz WE.** (2015) Species composition of the genus *Saprolegnia* in fin fish aquaculture environments, as determined by nucleotide sequence analysis of the nuclear rDNA. *Fungal Biology* 119: 27–43.
- Baten MA, Asano T, Motohashi K, Ishiguro Y, Rahman MZ, Inaba S, Suga H, Kageyama K.** (2014) Phylogenetic relationships among *Phytopythium* species, and re-evaluation of *P. fagopyri* comb. nov., recovered from damped buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress* 13: 1003–1014.
- Beakes GW, Sekimoto S.** (2009) The evolutionary phylogeny of oomycetes - insights gained from studies of holocarpic parasites of algae and invertebrates. *In: Lamour K, Kamoun S. (Eds.). Oomycete Genetics and Genomics. John Wiley & Sons, United States, pp 1–24.*
- Beakes GW, Glockling LS, Sekimoto S.** (2012) The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *249: 3–19.*
- Beakes GW, Honda D, Thines M.** (2014) Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *In: McLaughlin DJ,*

- Spatafora JW. (Eds). The Mycota VIII Part A, Springer-Verlag, Germany, pp 39–978.
- Beakes GW, Thines M, Honda D.** (2015) Straminipile “fungi”– taxonomy. eLS. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons Ltd.
- Beakes, GW, Thines, M.** (2017) Hyphochytriomycota and Oomycota. *In:* Archibald J, Simpson A, Slamovits C. (Eds.) Handbook of the Protists. Springer International Publishing, Cham, pp 435–505.
- Belmonte R, Wang T, Duncan GJ, Skaar I, Melida H, Bulone V, Secombes CJ.** (2014) Role of pathogen-derived cell wall carbohydrates and prostaglandin E2 in immune response and suppression of fish immunity by the oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Infection and Immunity* 82: 4518–4529.
- 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.
- Blazer V, Phillips S, Pendleton E.** (1999) Fish health, fungal infections, and *Pfiesteria*: The role of the U.S. Geological Survey. Fact sheet: U.S. Geological Survey, 98–114.
- Bly JE, Lawson LA, Abdel-Aziz ES, Clem LW.** (1993) Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immunity to *Saprolegnia* sp. *Journal of Applied Aquaculture* 3: 35–50.
- Bly JE, Quiniou SMA, Lawson LA, Clem LW.** (1996) Therapeutic and prophylactic measures for winter saprolegniosis in channel catfish. *Disease Aquatic Organism* 24: 25–33.

- Bosco SMG, Bagagli E, Araujo Jr JP, Candeias JMG, Franco MF, Marques MEA, Mendoza L, Camargo RP, Marques AS.** (2005) Human Pythiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 11: 715–718.
- Bouket AC, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Tojo M.** (2016) Morphological and molecular characterization of *Phytophthium litorale* and *Pp. oedochilum* from Iran. *Nova Hedwigia* 102: 257–270.
- Bruno DW, Van West P, Beakes GW.** (2011) *Saprolegnia* and other oomycetes. In: Woo PTK, Bruno DW. (Eds.). *Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Vol. 3. CABI Publishing, Wallingford, pp 599–659.
- Buaya A, Inaba SPS, Thines M.** (2019) Holocarpic oomycete parasitoids of red algae are not *Olpidiopsis*. *Fungal Systematics and Evolution* 4: 21–31.
- Buaya AT, Thines M.** (2020) Diatomophthoraceae – a new family of *Olpidiopsis*-like diatom parasitoids largely unrelated to *Ectrogella*. *Fungal Systematics and Evolution* 5: 113–118.
- Bul-Karim N, Furhan BT, Nazar MA.** (1989) Isolation of three water molds from two freshwater fishes and insect exuviae, *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering*, 24: 17–22.
- Cao H, Zheng W, Xu J, Ou R, He S, Yang X.** (2012) Identification of an isolate of *Saprolegnia ferax* as the causal agent of saprolegniosis of Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) eggs. *Veterinary Research Communications* 36: 239–244.
- do Carmo PMS, Uzal FA, Riet-Correa F.** (2021) Diseases caused by *Pythium insidiosum* in sheep and goats: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 33:20–24.

- Caramel BP, Moraes MAB, do Carmo CF, Vaz-dos-Santos AM, Tabata YA, Osti JAS, Ishikawa CM, Cerqueira MAS, Mercante CTJ.** (2014) Water Quality Assessment of a Trout Farming Effluent, Bocaina, Brazil. *Journal of Water Resource and Protection* 6: 909–915.
- Carballo M, Torroba M, Munoz MJ, Sanchez C, Tarazona JV, Dominguez J.** (1992) Effect of copper and cyanide on some immunological parameters and stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish immunology* 2: 121–129.
- Carraschi SP, Cruz C, Ranzani-Paiva MJT.** (2018) Isolation of *Saprolegnia aenigmatica* oomycetes and protocol for experimental infection in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 33: 324–327.
- Chauhan R.** (2014) Fungal attack on *Tilapia mossambicus* in culture ponds, leading to mortality of fishes. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 5: 425–428.
- Chien CY.** (1981) Observations on the growth and morphology of saprolegniaceous fungi isolated from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Pathology* 15: 241–247.
- Chitasombat MN, Jongkhajornpong P, Lekhanont K, Krajaejun T.** (2020) Recent update in diagnosis and treatment of human pythiosis. *PeerJ-Life & environment* 8:e8555.
- Choi YJ, Lee SH, Nguyen TTT, Nam B, Lee HB.** (2019) Characterization of *Achlya americana* and *A. bisexualis* (Saprolegniales, Oomycota) Isolated from Freshwater Environments in Korea. *Mycobiology* 47: 135–142
- de Cock A, Lodhi AM, Rintoul TL, Bala K, Robideau GP, Abad GZ, Coffey MD, Shahzad S, Lévesque CA.** (2015) *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25–39.

- Coker WC.** (1923) The Saprolegniaceae with notes on other water molds, 1st edn. University North Carolina Press, United States.
- Corrêa BF, Stoh FE, Robaldo BR, Pereira DIB.** (2013) Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. *Ciência Rural- Santa Maria* 43: 1021–1024.
- Costa, MF, Silva DFM, Rocha JR.** (2010) Diversidade e potencial patogênico de fungos zoospóricos (Chytridiomycota e Oomycota) no criatório de peixes, no povoado Pinto, município de Timon, Maranhão. *In: XIX Seminário de Iniciação Científica da UFPI, Teresina. XIX Seminário de Iniciação Científica da UFPI.*
- Culp SJ, Beland FA.** (1996) Malachite green: a toxicological review. *Journal of the American College of toxicology* 15: 219–238.
- Czeczuga B.** (1996) Aquatic fungi in the lake Sejnycomplex. *Acta Mycological* 31: 33–44.
- Czeczuga B, Woronowicz L.** (1993) Aquatic fungi developing on the eggs of certain freshwater fish species and their environment. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 23: 39–57.
- Czeczuga B, Muszyńska E, Tryggvadottir SV.** (1996) Aquatic fungi growing on the eggs of nine salmonid species of the genus *Hucho*, *Salmo* and *Salvelinus*. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 26: 113–124.
- Czeczuga B, Kiziewicz B.** (1999) Zoosporic fungi growing on eggs of *Carassius carassius* (L.) on oligo and eutrophic water. *Polish Journal of Environmental Studies* 8: 58–63.
- Czeczuga B, Kozłowska M, Godlewska A.** (2002) Zoosporic aquatic fungi growing on dead specimens of 29 freshwater crustacean species. *Limnologica* 32: 180–193.

- Czczuga B, Bartel R, Kiziewicz B, Godlewska A, Muszyńska E.** (2005) Zoosporic Fungi growing on the eggs of Sea Trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) in River Water of Varied Trophicity Polish. *Journal of Environmental Studies* 3: 295–303.
- Czczuga B, Godlewska A, Mazalska B, Muszyńska E.** (2010) Straminipilous organisms growing on herbivorous pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) and carnivorous piranha (*Pygocentrus nattereri*) from Poland. *Brazilian Journal of Biology* 2: 335–339.
- Czczuga B, Bartel R, Semeniuk A, Czczuga–Semeniuk E, Muszyńska E, Godlewska A, Mazalska B, Grochowski A.** (2011) Straminipilous organisms (Mycota) growing on the eggs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) entering Polish rivers for spawning or reared in fresh water. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology* 15: 73–81.
- Czczuga B, Czczuga-Semniuk E, Semniuk-Grell A.** (2015a) Observations of mycotal species growth on the rainbow trout eggs (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Microbiology research* 9: 515–520.
- Czczuga B, Czczuga-Semeniuk E, Semeniuk-Grell A.** (2015b) Ecological diversity and economic importance of species from *Aphanomyces* genus. *African Journal of Agricultural Research* 10: 4356–4363.
- Czczuga B, Semeniuk-Grell A, Czczuga-Semeniuk E.** (2015c) Growth of mycotal species on the eggs of *Cyprinus carpio* in limnologically and trophically different water Bodies. *African Journal of Biotechnology* 14: 482–488.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.** (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Das SK, Murmu K, Das A, Shakuntala I, Das RK, Ngachan SV, Majhi SK.** (2012) Studies on the identification and control of pathogen *Saprolegnia* in selected

Indian major carp fingerlings at mid hill altitude. *Journal of Environmental Biology* 33: 545–549.

Dervis S, Turkolmez S, Cifci O, Ozer G, Ulubas Serce C, Dikilitas, M. (2020) *Phytophthium litorale*: A novel killer pathogen of plane (*Platanus orientalis*) causing canker stain, root and collar rot. *Plant Disease* 104: 2642–2648.

Dick MW. (1989) *Phytophthora undulata* comb. nov. *Mycotaxon* 35: 449–453.

Dick MW. (2001) Oomycota. In: McLaughlin D, McLaughlin E, Lemke CA. (Eds.). *The Mycota VII Part A. Systematics and evolution.* Springer, Berlin, pp 48–72.

Diéguez-Uribeondo J, Fregeneda-Grandes JM, Cerenius L, Pérez-Iniesta E, Allergancedo JM, Tellería MT, Söderhäll K, Martín MP. (2007) Reevaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetic Biology* 44: 85–601.

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.

Drechsler C. (1927) Two water molds causing tomato rootlet injury. *Journal of Agricultural Research* 34: 287–296.

Drechsler C. (1929) The beet water mold and several related root parasites. *Journal of Agricultural Research* 38: 309–361.

Drechsler C. (1953) Two New Species of *Plectospira* Isolated from Discolored Rootlets. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 80: 385–400.

Duan J, Feng Y, Huang X, Wang K, Geng Y, Deng Y, Ou Y, Chen D, Yang S.

(2018) A Review: Factors Affecting Outbreaks of Saprolegniosis on Aquatic Animals. *The Israel of aquaculture* 70: 1–11.

Dubey M, Zehra A, Meena M, Upadhyay R. (2018) Taxonomic note on a rare fish infecting freshwater mould *Achlya ambisexualis* Raper 1939 (Achlyaceae) isolated from Chandraprabha dam, Uttar Pradesh, India. *Indian Journal of Fisheries* 65: 71–78.

Dzyuba EV, Kondratov IG, Maikova OO, Nebesnykh IA, Khanaev IV, Denikina NN. (2020) Water Molds of the Order Saprolegniales (Oomycota) in Association with Fish and Sponge Species from Lake Baikal *Biology. Bulletin* volume 47: 514–521.

El-Feki M, Hatai K, Hussein MMA. (2003) Chemotactic and chemokinetic activities of *Saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. *Mycoscience* 44: 159–162.

El-Hakin ESA, Eman Z, Viola RSZ. (2019) Incidence of Saprolegniasis in *Oreochromis niloticus* in El-Manzala fish farm with special reference to molecular diagnosis and histopathological alteration. *Annals of Veterinary and Animal Science* 7. (disponível em: <https://naturepub.org/wp-content/uploads/2020/02/AVAS-71-2.pdf>, com acesso em 08 de janeiro de 2020).

Fadaeifard F, Mehdi R, Bahrami H, Rahimi E, Najatipoor A. (2011) Freshwater fungi isolated from eggs and broodstocks with an emphasis on *Saprolegnia* in rainbow trout farms in West Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4: 3647–3651.

FAO (2014) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Itália, Roma pp 223.

(Disponível em: www.faor.org/publications com acesso em 8 de janeiro de 2020).

- FAO** (2015) Food outlook: Biannual report on global food markets. Food and Agriculture Organization of the United Nations pp 140. (Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i5003e.pdf>, com acesso em 4 de janeiro de 2021).
- Ferreira KS, Tachibana L, Colombo DRS, da Paixão SCO, Ferreira CM, Badaró-Pedroso C.** (2021) Toxic effects in *Aphanomyces brasiliensis* and zebrafish embryos caused by oomycetocidal. *Diseases of Aquatic Organisms* 144: 75–87.
- Firooz F, Mehdi R, Bahrami H, Rahimi E, Ahmad N.** (2011) Freshwater fungi isolated from eggs and broodstocks with na emphasis on *Saprolegnia* in rainbow trout farms in West Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4: 3647–3651.
- Forshell G.** (2002) Rainbow Trout — Challenges and Solutions. *Reviews in Fisheries Science* 10: 545–557.
- Fregeneda-Grandes, JM, Fernandez DM, Aller Gancedo JM.** (2001) Experimental pathogenicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of two distinct morphotypes of longspined *Saprolegnia* isolates obtained from wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water. *Journal of Fish Disease* 24: 351–359.
- Fregeneda-Grandes JM, Rodriguez-codenas F, Aller-Gancedo JM.** (2007) Fungi isolated from cultured eggs, alevins and broodfish of brown trout in a hatchery affected by saprolegniosis. *Journal of fish Biology* 71: 510–518.
- Fuller MS, Jaworski A.** (1987) Zoospore fungi: teaching and research. Southeastern Publishing Corporation, Athens, 303p.
- Furtado JS.** (1965) A new aquatic fungi, *Achlya benekei* sp. nov. *Rickia* 2: 121–127.
- Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L.** (2010) *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology* 146: 1–16.

- Gaulin E, Jacquet C, Bottin A, Dumas B.** (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology* 8: 539–548.
- Gieseke CM, Serfling SG, Reimschuessel R.** (2006) Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 253: 120–129.
- Gil JP.** (2018) Study of novel carbohydrate sources on rainbow trout “*Oncorhynchus mykiss*” diets. Universitat Politècnica de Valencia, Valencia, Tese de doutorado, 367p.
- Gleason FH, Lilje O.** (2009) Structure and function of fungal zoospores: ecological implications. *Fungal Ecology* 2: 53–59.
- Gleason FH, Chambouvet A, Sullivan BK, Lilje O, Rowley JJJL.** (2014) Multiple zoosporic parasites pose a significant threat to amphibian populations. *Fungal Ecology* 11: 181–192.
- Gomes ADL, Vieira VARO, Tabata YA, Takahashi NS, Moreira RG, Ribeiro CR.** (2020) Ploidy influences on metabolic substrate deposition of rainbow trout. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 42: e44580.
- Gomes AL, Pires-Zottarelli CLA, Rocha M, Milanez AI.** (2003) Saprolegniaceae de áreas de Cerrado do estado de São Paulo, Brasil, *Hoehnea* 30: 95–110.
- 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.

- Gonçalves AA, Gagnon GA.** (2011) Ozone application in recirculating aquaculture system: an overview, ozone: Science & engineering. Journal International Ozone Association. 33: 345–367.
- Gonçalves DR, Jesus AL, Pires-Zottarelli CLA.** (2016) *Pythium* and *Phytophthium* species associated with hydroponically grown crops around the city of São Paulo, Brazil. Tropical Plant Pathology 41: 397–405.
- González-Palacio C, Fregeneda-Grandes JM, Aller-Gancedo JM.** (2020) Possible Mechanisms of Action of Two *Pseudomonas fluorescens* Isolates as Probiotics on Saprolegniosis Control in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Animals 10: 1507.
- Good C, Davdson J, Straus DL, Harper L, Marancik D, Welch T, Pertenson B, Pdersern LF, Lepine C, Redman N, Meinelt T, Liu D, Summerfelt S.** (2020) Assessing peracetic acid for controlling post-vaccination *Saprolegnia* spp.-associated mortality in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* in freshwater recirculation aquaculture. Aquaculture Research 51: 2624–2627.
- Gowen RJ, Rosenthal H, M/ikinen T, Ezzi I.** (1990) Environmental impacts of aquaculture activities. In: de Pauw N, Billard R. (Eds.). Aqua- culture Europe'89 - Business Joins Science, European Aquaculture Society, 12, Bredene, Belgium, pp 257–283.
- Gozlan RE, Marshall WL, Lilje O, Jessop CN, Gleason FH, Andreou D.** (2014) Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? Frontiers in Microbiology 5: 1–16.
- Grooters AM.** (2003) Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 33: 695–720.

- Grossart HP, Rojas-Jimenez K.** (2016) Aquatic fungi: targeting the forgotten in microbial. *Current Opinion Microbiology* 31: 140–145.
- Guimarães PFAN.** (2014) Ensaio ecotoxicológico como ferramenta para avaliação de efluente de triticultura. Instituto de Pesca, São Paulo, Dissertação de mestrado, 68p.
- 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.
- Hall TA.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Halo BA, Al-Yahyai RA, Maharachchikumbura SSN, Al-Sadi AM.** (2019) *Talaromyces variabilis* interferes with *Pythium aphanidermatum* growth and suppresses *Pythium*-induced damping-off of cucumbers and tomatoes. *Science Report* 9: 11255.
- Hamad SM, Mustafa SA.** (2018) Effect of ozonated water treatment on clinical signs, survival rate, and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L. infected with *Saprolegnia* spp. *The Pakistani Journal of Biotechnology* 15: 273–281.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD.** (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1–9.
- Hassett BT, Thines M, Buaya A, Ploch S, Gradinger R.** (2019) A glimpse into the biogeography, seasonality, and ecological functions of arctic marine Oomycota. *IMA Fungus* 10: 6.

- Hatai K, Willoughby LG, Beakes GW.** (1990) Some characteristics of *Saprolegnia* obtained from fish hatcheries in Japan. *Mycological Research* 94: 182–190.
- Hatai K, Hoshiai GI.** (1993) Characteristics of two *Saprolegnia* species from *Coho salmon* with Saprolegniosis. *Journal of Aquatic Animal Health* 5: 115–118.
- Hatai K, Hoshiai GI.** (1994) Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* Coker. In: Mueller GJ, (ed.). *Salmon Saprolegniasis*. Portland: US Department of Energy, pp 87–98.
- Haverkort AJ, Struik PC, Visser RGF, Jacobsen E.** (2009) Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 52: 249–264.
- Henrique SM, Pilati GVT, Snak A, Costa BB, Aguiar AR, Skoronski E, Moura AB.** (2020) Parasitos em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) criadas em sistema intensivo na região serrana de Santa Catarina, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 72: 2387–2390.
- Hosseini S, Heyman F, Olsson U, Broberg A, Jensen DF, Karlsson M.** (2014) Zoospore chemotaxis of closely related legume-root infecting *Phytophthora* species toward host isoflavones. *Plant Pathology* 63: 708–714.
- Huang JH, Chen CY, Lin YS, Ann PJ, Huang HC, Chung WH.** (2013) Six new species of *Pythiogeton* in Taiwan, with an account of the molecular phylogeny of this genus. *Mycoscience* 54: 130–147.
- Hudspeth DSS, Nadler SA, Hudspeth MES.** (2000) A COX2 molecular phylogeny and phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* 92: 674–684.
- Hussein MMA, Hatai K, Nomura T.** (2001) Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. *Journal Wildlife Diseases* 37: 204–207.

- Hussein MMA, Hatai K.** (2002) Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. *Fisheries Science* 68: 1067–1072.
- Hussein MMA, Hassan WH, Mahmoud MA.** (2013) Pathogenicity of *Achlya proliferoides* and *Saprolegnia diclina* (Saprolegniaceae) associated with saprolegniosis outbreaks in cultured Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences* 5: 188–193.
- Iberahim NA, Trusch F, HiberahimPW.** (2018) *Aphanomyces invadans*, the causal agent of Epizootic Ulcerative Syndrome, is a global threat to wild and farmed fish. *Fungal Biology Reviews* 32: 118–130.
- Jaies I, Shah FA, Abubakr A, Asmi O, Bhat BA, BalkhiMH.** (2020) PCR Based Identification of *Saprolegnia parasitica* Affecting Rainbow Trout Aquaculture in Kashmir Region of Indian Himalayas. *Indian Journal of Animal Research* 54: 1149–1154.
- Jee HJ, Ho HH, Cho WD.** (2000) *Pythiogeton zae* sp. nov. causing root and basal stalk rot of corn in Korea. *Mycologia* 92: 522–527.
- Jerônimo GH, de Jesus AL, Rocha SCO, Gonçalves DR, Pires-Zottarelli CLA.** (2017) New insights into *Plectospira* genus (oomycetes, Straminipila): morphological and molecular analyses. *Phytotaxa* 307:191–198.
- Jesus AL, Marano AV, Schoenlein-Crusius IH, Pires-Zottarelli CLA.** (2013) Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40: 67–180.
- 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.

- Jesus AL, Marano AV, Jêronimo GH, de Souza JI, Leño EM, PiresZottarelli CLA.** (2016) The genus *Halophytophthora* (Peronosporales, Straminipila) in Brazil: first descriptions of species. *Brazilian Journal of Botany* 39: 729–739.
- Jesus AL, Marano AV, Gonçalves DR, Jerônimo GH, Pires-Zottarelli CLA.** (2019) Two new species of *Halophytophthora* from Brazil. *Mycological Progress* 18: 1411–1421.
- Johnson Jr TW.** (1956) The genus *Achlya*: Morphology and taxonomy. University of Michigan press, EUA.
- Johnson Jr TW, Seymour RL, Padgett DE.** (2002) Biology and systematics of Saprolegniaceae. Disponível em: <http://www.uncw.edu/people/padgett/book>. Acesso em 12 de setembro de 2020.
- Judelson HS, Shrivastava J, Manson J.** (2012) Decay of genes encoding the oomycete flagellar proteome in the downy mildew *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *PloS One* 7: e47624.
- Judelson HS, Ah-Fong AMV.** (2018) Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease. *Plant Physiology* 179: 1198–1211.
- Karling JS.** (1981) Predominantly holocarpic and eucarpic simple biflagellate Phycomycetes. *Journal Cramer, Vaduz*.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD.** (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings Bioinformatics* bbx108: 1–7.
- 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.

- Kim GH, Moon KH, Kim J-Y, Shim J, Klochkova TA.** (2014) A revaluation of algal diseases in Korean Pyropia (*Porphyra*) sea farms and their economic impact. *Algae* 29: 249–265.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA.** (2008) Dictionary of fungi. 10a ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Kitancharoen N, Hatai K.** (1996) Experimental infection of *Saprolegniasis* spp. in Rainbow trout eggs. *Fish Pathology* 31: 49–50.
- Kiziewicz B, Diéguez-Uribeondo J, Martin MP.** (2013) Water molds *Saprolegnia diclina* (FLO) isolated from eggs of *Carassius carassius* L. in Bialystok Rivers, Poland. *Academic journals* 7: 5406–5410.
- Klochkova TA, Shin YJ, Moon KH, Motomura T.** (2016) New species of unicellular obligate parasite, *Olpidiopsis pyropiae* sp. nov., that plagues Pyropia sea farms in Korea. *Journal of applied physiology* 28: 73–83.
- Korzelecka-Orkisz A, Formicki K, Szulc J, Tanski A, Mazurkiewicz-Zapalowicz K, Twaruzek M, Grzonka J, Kurzydłowski KJ.** (2016) Modulating effect of a magnetic field on *Saprolegnia parasitica*, Coker, 1923 infecting trout (*Salmo trutta*, L.) eggs. *Journal of Applied Ichthyology* 32: 913–922.
- Krishna L, Gupta VK, Katoch RC, Singh D.** (1990) Saprolegniosis in indian major carps -an investigation. *Indian Veterinary Journal* 67: 554–555.
- Kumar PI, Sarkar P, Raju SV, Manikandan V, Guru A, Aziz, Arockiaraj, Arshad A, Elumalai P, Arockiaraj J.** (2020) Pathogenicity and Pathobiology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Causing Fungus *Aphanomyces invadans* and Its Immunological Response in Fish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 3: 358–375.

- Lacerda ACF, Yamada FH, Antonucci AM, Dias MT.** (2013) Peixes introduzidos e seus parasitos. *In:* Pavanelli GC, Takemoto RM, Eiras JC. (Eds.). Parasitologia de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Eduem, pp 169–193.
- Lara E, Belbahri L.** (2011) SSU rRNA reveals major trends in oomycete evolution. *Fungal diversity* 49: 93–100.
- Lau LM, Hatai K, Fukano H, Kurata O.** (2018) First report of *Achlya oblongata* infection in freshwater-Reared Asian Seabass lateres calcarifer. *Journal of aquatic animal health.* 30: 239–244.
- Lau CH, Snook ER, Swinford AK, Bryan LK.** (2020) *Achlya* sp. dermatitis in an American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Comparative Pathology* 175: 1–4.
- Lazarotto H, Caramaschi EP.** (2009) Introduction of rainbow trout in Brazil: history, law, and current trends. *Oecologia Brasiliensis* 13: 649–659.
- Leclerc CMC, Guillot J, Deville M.** (2000) Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology* 77: 369–377.
- Lévesque CA, de Cock AW.** (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108:1363–1383.
- Li GJ, Hyde KD, Zhao RL, Hongsanan S, Abdel-Aziz FA, Abdel-Wahab MA, Alvarado P, Alves-Silva G, Ammirati JF, Ariyawansa HA, Baghela A, Bahkali AH, Beug M, Bhat DJ, Bojantchev D, Boonpratuang T, Bulgakov TS, Camporesi E, Boro MC, Ceska O, Chakraborty D, Chen JJ, Chethana KWT, Chomnunti P, Consiglio G, Cui BK, Dai DQ, Dai YC, Daranagama DA, Das K, Dayarathne MC, Crop ED, Oliveira RJV, de Souza CAF, de Souza JI, Dentinger BTM, Dissanayake AJ, Doilom M, Drechsler-Santos ER, Ghobad-**

Nejhad M, Gilmore SP, Góes-Neto A, Gorczak M, Haitjema CH, Hapuarachchi KK, Hashimoto A, He AMQ, Henske JK, Hirayama K, Iribarren MJ, Jayasiri SC, Jayawardena RS, Jeon SJ, Jerônimo GH, Jesus AL, Jones EBG, Kang JC, Karunarathna SC, Kirk PM, Konta S, Kuhnert E, Langer E, Lee HS, Lee HB, Li WJ, Li XH, Liimatainen K, Lima DX, Lin CG, Liu JK, Liu XZ, Liu ZY, Luangsa-ard JJ, Lücking R, Lumbsch HT, Lumyong S, Leño EM, Marano AV, Matsumura M, McKenzie EHC, Mongkolsamrit S, Mortimer PE, Nguyen TTT, Niskanen T, Norphanphoun C, O'Malley MA, Parnmen S, Pawłowska J, Perera RH, Phookamsak R, Phukhamsakda C, Pires-Zottarelli CLA, Raspé O, Reck MA, Rocha SCO, de Santiago ALCMA, Senanayake IC, Setti L, Shang QJ, Singh SK, Sir EB, Solomon KV, Song J, Srikitikulchai P, Stadler M, Suetrong S, Takahashi H, Takahashi T, Tanaka K, Tang LP, Thambugala KM, Thanakitpipattana D, Theodorou MK, Thongbai B, Thummarukcharoen T, Tian Q, Tibpromma S, Vizzini VAA, Vlasák J, Voigt K, Wanasinghe DN, Wang Y, Weerakoon G, Wen HA, Wen TC, Wijayawardene NN, Wongkanoun S, Wrzosek M, Xiao YP, Xu JC, Yan JY, Yang J, Yang SD, Hu Y, Zhang JF, Zhao J, Zhou WJ, Peršoh D, Phillips AJL, Maharachchikumbura SSN. (2016) Fungal diversity notes 253–366: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity* 78: 1–237.

Lilley JH, Thompson KD, Adams A. (1997) Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Diseases of aquatic organisms* 30: 187–197.

- Lilley JH, Hart D, Panyawachira V, Kanchanakhan S, Chinabut K, derhfalls, Cerenius L.** (2003) Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *Journal of Fish Diseases* 26: 263–275.
- Liu YJJ, Hodson MC, Hall BD.** (2006) Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology* 6: 74–87.
- Liu YJJ, Rzeszutek E, van der Voort M, Wu CH, Thoen E, Skaa I, Bulone V, Dorrestein PC, Raaijmakers JM, de Bruijn I.** (2015) Diversity of Aquatic *Pseudomonas* Species and Their Activity against the Fish Pathogenic Oomycete *Saprolegnia*. *PLoS ONE* 10: e0136241.
- Lone SA, Manohar S.** (2018) *Saprolegnia parasitica*, A Lethal Oomycete Pathogen: demands to be controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology* 6: 36–44.
- López JAM.** (2018) Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del lago Titicaca. Perú, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, tese de doutorado, 80p.
- López-Lastra CC, Scorsetti AC, Marti GA, García JJ.** (2004) Host range and specificity of an Argentinean isolate of the aquatic fungus *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales), a pathogen of mosquito larvae (*Diptera*: Culicidae), *Mycopathologia* 158: 311–315.
- Lustosa MJ, Rocha JRS.** (2019) Oomicetos (Oomycota) no Complexo Açude Joana, Pedro II, Piauí, Brasil. *Rodriguésia* 70: e00222017.
- 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.

- Macedo MAM, Rocha JRS.** (2017) Dinâmica da comunidade de Oomicetos (Oomycota) do riacho Mutum, Demerval Lobão, Piauí, Brasil. *Gaia Scientia* 11: 162–176.
- Machado JL, Rocha JRS.** (2019) Oomicetos (Oomycota) no Complexo Açude Joana, Pedro II, Piauí, Brasil. *Rodriguesia* 70: e00222017.
- MachadoTM, Tabata, YA, Takahashi NS, Casarini, LM, Neiva CR, Pinheiro H, Barbosa M.** (2016) Caviar substitute produced from roes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Scientiarum Technology* 38: 233–240.
- Magray AR, Lone SA, Ganai BA, Ahmad F, Dar G J, Dar JS, Rehman S.** (2019) Comprehensive, classical and molecular characterization methods of *Saprolegnia* (Oomycota; Stramnipila), an important fungal. Fungal biology pathogen of fish. (Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461318300502, com acesso em 30 de janeiro de 2019).
- Magurran AE.** (1988) Ecological diversity and its measurement. – Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.
- Mahboub HH, Shaheen AA.** (2021) Mycological and histopathological identification of potential fish pathogens in Nile tilapia. *Aquaculture* 530:735849.
- 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 CG, 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, 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.
- Marano AV, Steciow MM.** (2006) Frequency and abundance of zoosporic fungi in some lotic environments of Buenos Aires province (Argentina). *Journal of Agricultural Technology* 2: 17–28.
- Marano AV, Barrera MD, Steciow MM, Donadelli JL, Sparrat MCN.** (2008) Frequency, abundance and distribution of zoosporic organisms from Las Canas stream (Buenos Aires, Argentina). *Mycologia* 100: 691–700.
- Marano AV, Barrera MD, Steciow MM, Gleason FH, PiresZottarelli CLA, Donadelli JL.** (2011) Diversity of zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles in Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina): assemblages colonizing baits. *Fundamental and Applied Limnology* 178: 203–218.
- Marano AV, Jesus AL, de Souza JI, Leño EM, James TY, Jerônimo GH, de Cock AWAW, Pires-Zottarelli CLA.** (2014) A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5: 510–522.
- Marano AV, Gleason FH, Rocha SCO, Pires-Zottarelli CLA, de Souza JI.** (2017) Crown oomycetes have evolved as effective plant and animal parasites. *In*: Dighton J, White JF. (Eds.). *The fungal community*. CRC Press, United States, pp 257–272.
- Martin FN, Loper JE.** (1999) Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:111–181.
- Martín-Torrijos L, Llach MC, Pou-Rovira Q, Diéguez-Uribeondo J.** (2017) Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the

- endangered freshwater crayfish species, *Austropotamobius pallipes*. PLoS ONE 12: e0181226.
- Mastan SA.** (2015) Fungal infection in freshwater fishes of Andhra Pradesh, India. Africa Journal Biotechnol 14: 530–534.
- Mastan SA, Begum SA, Osman SA, Ahmed MD, Shamshad S.** (2015) Mycotic infection in some economically important freshwater fishes. World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science 4: 121–129.
- Mastan SA, Ahmad MO.** (2018) Observations on *saprolegnia* infection in freshwater fishes of Lake Kolleru. International. Journal of Fisheries and Aquatic Studies 6: 102–105.
- Mcleod A, Botha WJ, Meitz JC, Spies CFJ, Tewoldemedhin YT, Mostert L.** (2009) Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. Mycological research 13: 933–951.
- Medonza L, Vilela R.** (2013) The mammalian Pathogenic Oomycetes. Current Fungal Infection Reports 7:198–208.
- Mert F, Turkolmez S, Ozer G, Dervis S, Ciftci O.** (2020) First report of *Phytophthora litorale* causing root rot of apple in Turkey. Journal of Plant Pathology 102: 1361–1362.
- Meyer FP.** (1991) Aquaculture disease and health management. Journal of Animal Science 69: 4201–4208.
- Milanez AI.** (1989) Fungos de águas continentais. In: Fidalgo O, Bononi VL. (Eds.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo, pp 17–20.

- 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.** (2007) *Brazilian Zoosporic Fungi*. Instituto de Botânica, São Paulo, pp 1-112.
- Ministério da Pesca e aquicultura** (2012) Análise de risco de importação- Alevinos da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) originários de aquicultura de Singapura destinados à multiplicação animal. 1ª edição.
- Miranda ML, Pires-Zotarelli 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.
- Montalva C, dos Santos K, Luiz KC, Rocha FN, Fernandes EKK, Castrillo LA, Luz C, Humber RA.** (2016) First report of *Leptolegnia chapmanii* (Peronosporomycetes: Saprolegniales) affecting mosquitoes in central Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 109–116.
- Moore-Landerck E.** (1996) *Fundamentals of the fungi*. 4a edição. Prentice hall USA.
- Moraes MAB, Carmo F, Tabata YA, Vaz-dos-Santos AM, Mercante CTJ.** (2016) Environmental indicators in effluent assessment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in raceway system through phosphorus and nitrogen. *Brazilian Journal of Biology* 76: 1021–1028.

- Mousavi HAE, Soltani M, Khosravi AR, Mood SM, Hosseinifard M.** (2009) Isolation and Characterization of Saprolegniaceae from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eggs in Iran. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 4: 330–333.
- Müller-Dombois D, Elleberg H.** (1974) Mathematical treatment of vegetation data. *In: Aims and methods of vegetation ecology.* John Wiley & Sons, New York, pp 211–302.
- Nascimento CA, Gomes EPC, Pires-Zottarelli CLA.** (2011) Occurrence and distribution of zoosporic organisms in water bodies from Brazilian Cerrado. *Mycologia* 103: 261–272.
- do Nascimento ITVS, Silva JS, de Melo TA, Santos DMS, Serra IMRS.** (2020) Registry of saprolegniouse in fish cultivated in the world: a compilation of data. *Research, Society and Development* 9: 11 e959119556.
- Nam B, Choi YJ.** (2019) *Phytophthium* and *Pythium* Species (Oomycota) Isolated from Freshwater Environments of Korea. *Mycobiology* 47: 261–272.
- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M.** (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017–1024.
- Naznin T, Hossain MJ, Nasrin T, Hossain Z, Sarowar MN.** (2017) Molecular characterization reveals the presence of plant pathogenic *Pythium* spp. around Bangladesh Agricultural University campus, Mymensingh, Bangladesh. *International Journal of Agricultural Research* 12: 199–205.
- Nechwatal J, Mengden K.** (2006) *Pythium litorale* sp. nov., a new species from the littoral of lake constance, Germany. *FEMS Microbiology Letters* 255: 96–101.

- Noga EJ.** (1993) Water mold infections of freshwater fish: Recent advances. Annual Review of Fish Diseases Journal 3: 291–304.
- Noga EJ.** (1996) Fish Disease. Diagnosis and Treatment. St. Louis: Mosby, p367.
- Noga EJ.** (2010) Fish disease: Diagnosis and Treatment. 2. Ed. John Wiley & Sons, Iowa.
- Noga EJ, Levine JF, Dykstra MJ, Hawkins JH.** (1988) Pathology of ulcerative mycosis in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. Diseases of aquatic organism 4: 189–197.
- Nowicki M, Foolad M, Nowakowska M, Kozik M.** (2011) Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding. Plant Disease 96: 4–17.
- Nzungize JR, Lyumugabe F, Busogoro JP, Baudoin JP.** (2012) *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods: A review. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 16: 405–413.
- Ogbonna CIC, Alabi RO.** (1991) Studies on species of fungi associated with mycotic infections of fish in a Nigerian freshwater fishpond. Hydrobiologia 220: 131–135.
- Oidtmann B, Steinbauer P, Geiger S, Hoffman RW.** (2008) Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European Cratfish, Rainbow Trout and European eel. Disease aquatic organism 82: 195–207.
- Oono H, Hatai K.** (2007) Antifungal Activities of Bronopol and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MT) against *Saprolegnia*. Biocontrol science 12: 145–148.
- Oono H, Hatai K, Miura M, Tuchida N, Kiriu T.** (2007) The Use of Bronopol to Control Fungal Infection in Rainbow Trout Eggs. Biocontrol science 12: 55–57.
- Paperna, I, Di Cave D.** (2001) Branchiomycosis in an amazonian fish, *Baryancistrus* sp. (Loricariidae). Journal of Fish Diseases 24: 417–420.

- 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.
- Paul B.** (2002) *Pythium segnitium* sp. nov., isolated from the Canary Island- its taxonomy, ITS of rDNA, and comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 217: 207–212.
- Paxton CGM, Willoughby LG.** (2000) Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi. *Journal of Fish Biology* 57: 562–570.
- Pessier AP.** (2002) An overview of amphibian skin disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11: 162–174.
- 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.
- Philips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, van West P.** (2008) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 16: 13–19.
- Pickering AD, Willoughby LG.** (1982) *Saprolegnia* infections in Salmonid fish. *In:* Roberts RJ. (ed.). *Microbial disease of fish*, Academic Press, pp 271–297.

- Pinheiro CAM, Pinheiro RS, dos Santos WHL, Serra MRS, Santos DMS.** (2015) Qualidade da água e incidência de fungos em peixes oriundos de pisciculturas do município de São Luis Maranhão. *Pesquisa em foco* 20: 53–69.
- 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, 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, Colombo DRS, da Paixão SCO, Ventura PO, Boro MC, Jesus AL.** (2019) *Aphanomyces brasiliensis* sp. nov. (Verrucalvaceae, Saprolegniales): a new species from Brazilian Atlantic Rainforest areas. *Phytotaxa* 415:208–216.
- Plaats-Niterink van der AJ.** (1981) Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 1: 1–242.
- Posada D.** (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2: 1253–1256.
- Pradhan PK, Mohan CV, Shankar KM, Kumar MB.** (2008) Infection experiments with *Aphanomyces invadans* in advanced fingerlings of four different carp species. *In: Bondad-Reantaso MG, Mohan CV, Crumlish M, Subasinghe RP.* (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp 105–114.

- Prencipe S, Savian F, Nari L, Ermacora P, Spadaro D, Martini M.** (2020) First report of *Phytophthora vexans* causing decline syndrome of *Actinidiadeliciosa* ‘Hayward’ in Italy. *Plant Disease* 104: 216168711.
- Rahman KMM, Sarowar MN.** (2016) Molecular characterisation of oomycetes from fish farm located in Mymensingh sadar during summer. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 2: 236–246.
- Ramaiah N.** (2006) A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. *Journal of Marine Science* 35: 380–387.
- Rankovic B.** (2004) The fungal community of lake Sjenica, Serbia. *Journal Freshwater Ecology* 19: 325–332.
- Ranzani-Paiva MJT.** (1997) Fungos parasitos de peixes. *O Biológico, São Paulo- SP*, 59: 57–59.
- Rapuntean S, Gal A, Bacircea Z, Rapuntean GHE.** (2019) Saprolegniasis in trouts: epidemiology, clinical-anatomic aspects and diagnosis. *Romanian Journal of Veterinary Medicine & Pharmacology* 20: 248–263.
- Read P, Landos M, Rowland SJ, Mifsud C.** (2007) Diagnosis, treatment and prevention of the diseases of the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus*). NSW department of Primary industries. Fisheries Research and Development Corporation, Australian Government pp 84.
- Reyes FGR, Nunes KSD.** (2017) Ensuring Food Safety in Developing and Developed Countries: Aspects Associated with the Use of Veterinary Drugs in Fish Farming in Brazil. *Global Food Security and Wellness* pp 49–66.
- Rezinciuc S, Sandoval-Sierra JV, DiéguezUribeondo 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.

Rezinciuc S, Sandoval-Sierra JV, Oidtmann B, Diéguez-Uribeondo J. (2016) The biology of crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. Current answers to most frequent questions. *In: Kawai T, Faulkes Z, Scholtz G. (Eds.). Freshwater crayfish: a global overview.* CRC Press, Germany, pp 182–204.

Rezinciuc S, Sandoval-Sierra JV, Ruiz-León Y, van West P, Diéguez-Uribeondo J. (2018) Specialized attachment structure of the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *PLoS One* 13: e0190361.

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

Riethmüller A, Langer E. (2004) Seasonal occurrence of species of Saprolegniales and Leptomitales in Lake Aue and the River Fulda in Kassel (Hesse) with special consideration of fish pathogenic species. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 33: 622–634.

Riethmüller A, Grundel A, Langer E. (2006) The seasonal occurrence of the sewage fungus *Leptomitus lacteus* Roth C. Agard in stagnant and running waters of different chemistry of Hesse and Thuringia, Germany. *Acta Hydrochem Hydrobiol* 34: 58–66.

Rigolino MG, Tabata YA. (2011) Tratamento de água de abastecimento em piscicultura intensiva de fluxo contínuo. *Espaço pesquisa and tecnologia.*

(Disponível em: <http://www.meiofiltrante.com.br/internas.aspnoticias>, com acesso em 30 de janeiro de 2019).

Robertson EJ, Anderson VL, Philips AJ, Secombs CJ, Déguez-Uribeondo J, van West P. (2009) *Saprolegnia* - fish interactions. *In*: Lamour K, Kaumon S. (Eds.). Oomycete Genetics and Genomics: diversity, interactions, and research tools. John and Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp 407–424.

Robideau GP, de Cock AWAM, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJM, Ristaino JB, Lévesque AC. (2011) DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecological Resource* 11: 1002–1011.

Rocha JRS. (2002) Fungos zoospóricos em áreas de cerrado no "Parque Nacional de Sete Cidades", Piauí, Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo, tese de Doutorado, 266p.

Rocha JRS. (2006) Filos Chytridiomycota e Oomycota. *In*: Giullietti AM. (Ed.). Diversidade e caracterização dos fungos do semi-arido. Recife. Associação Plantas do Nordeste pp 75–95.

Rocha JRS, Silva DFM, Costa MF. (2011) Fungos zoospóricos em criatório de peixes. *Sapiência* 26: 3.

Rocha JRS, Sousa NDC, Negreiros NC, Santos LA Pereira AA, Sales PCL, Trindade Júnior OC. (2014) The genus *Pythiogeton* (Pythiogetonaceae) in Brazil. *Mycosphere* 5: 623–634.

- Rocha JRS, Soares BM.** (2017) First record of *Pythiopsis cymosa* de Bary (Saprolegniales: Oomycota) from freshwater fish in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 78: 386–382.
- Rocha JRS, Machado JL, Silva JB, Trindade Júnior OC, Santos LA, Rodrigues EP, Cronemberger AA.** (2018a) O gênero *Olpidiopsis* (Oomycota) no Nordeste do Brasil. *Rodriguesia* 69: 2035–2053.
- Rocha M, Pires-Zottarelli CLA.** (2002) Chytridiomycota e oomycota da Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. *Acta Botanica Brasilica* 16: 287–309.
- Rocha SCO.** (2016) Estudo morfológico e molecular de espécies de Saprolegniaceae e Leptolegniaceae de áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo, Brasil. Instituto de Botânica. São Paulo, dissertação de mestrado, 156pp.
- Rocha SCO, Sandoval-Sierra JV, Diéguez-Uribeondo J, GonçalvesDR, Jerônimo GH, Jesus AL, Marano, AV, Pires-Zottarelli CLA.** (2016a) *Saprolegnia milanezii* sp. nov., a new species of Saprolegniales (Oomycota, Straminipila) from Brazil. *Phytotaxa* 270: 286–294.
- Rocha SCO, Jerônimo GH, Marano AV, de Souza JI, Jesus AL, Pires-Zottarelli CLA.** (2016b) Oomycota from “Parque Estadual da Ilha do Cardoso” (PEIC): First records for São Paulo State and Brazil. *Cryptogamie mycologie* 37: 177-191.
- Rocha SCO, Lopez-Lastra CC, Marano AV, de Souza JI, Rueda-Páramo ME, Pires-ZottarelliCLA.** (2018b) New phylogenetic insights into Saprolegniales (Oomycota, Straminipila) based upon studies of specimens isolated from Brazil and Argentina. *Mycol progress* 17: 691–700.
- Rogers AL, Milanez AI, Beneke ES.** (1970) Additional aquatic fungi from São Paulo State. *Rickia* 5: 93–110.

- Ronquist, F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, H'ohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP.** (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Sakaguchi SO, Kasai H, Takishita K.** (2019) Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in Japan and possible sources of their infection. *Aquaculture International* 27: 739–1749.
- Sampaio, FG, da Silva CM, Mignani L, Packer AP, Manzato CP.** (2019) Monitoramento ambiental da aquicultura em águas da união: subsídios para a proposição de um plano nacional. Brasília, DF: Embrapa, 98p.
- Sandoval-Sierra JV, Latif-Eugenin F, Martín MP, Zaror L, Diéguez-Uribeondo J.** (2014a) *Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. *Aquaculture* 434: 462–469.
- Sandoval-Sierra JV, Martín MP, Diéguez-Uribeondo J.** (2014b) 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: 1–21.
- Santos, GS, Rocha JRS.** (2017) O gênero *Achlya* nees (oomycota) no estado do Piauí. *Pesquisas Botânica* 70: 95–107.
- Santurio JM. Alves SH, Pereira DB, Argenta JS.** (2006) Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 1–14.

- Saraiva LS.** (2016) Diversidade de oomicetos (Oomycota) em fazendas de pisciculturas em Terezina- Pi. Universidade Federal do Piauí. Dissertação de Mestrado, 99p.
- Saraiva LS, Rocha JRS.** (2019) Diversidade de Oomicetos (Oomycota) em tanques de piscicultura em Teresina, Piauí. *Pesquisas Botânica* 73: 227–247.
- Sarowar MN, Saraiva M, Jessop CN, Lilje O, Gleason FH, van West P.** (2014) Infection strategies of pathogenic oomycetes in fish. *In: Jones KDG, Hyde KL, Pang EB.* (Eds.). *Freshwater fungi and fungal-like organisms.* Walter de Gruyter GmbH, Germany, pp 217–243.
- Sarowar MN, Cusack R, Duston J.** (2019a) *Saprolegnia* molecular phylogeny among farmed teleosts in Nova Scotia, Canada. *Journal Fishes Diseases* 42: 1745–1760.
- Sarowar MN, Hossain MJ, Nasrin T, Naznin T, Hossain Z, Rahman MM.** (2019b) Molecular identification of oomycete species affecting aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture and Fisheries* 4: 105–113.
- Sati SC.** (1991) Aquatic fungi parasitic on temperate fishes of Kumaun Himalaya, India. *Mycoses* 34: 437–441.
- Sato GS, Tabata YA, Takahashi NS.** (2011) Truta de Campos do Jordão, valorização do produto local através da indicação geográfica, do turismo e da gastronomia. *Informações Econômicas* 41: 68–77.
- Saylor RK, Miller DL, Vandersea MW, Bevelhimer MS, Schofield PJ, Bennett WA.** (2010) Epizootic ulcerative syndrome caused by *Aphanomyces invadans* in captive bullseye snakehead *Channa marulius* collected from south Florida, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* 88: 169–175.
- Scheirer TM, Rach JJ, Howe GE.** (1995) Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture* 140: 323–331.

- 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 Itapeçerica 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.
- Schmitz A, Riesner D.** (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* 354: 311–313.
- Scott WW.** (1961) A revision of the genus *Aphanomyces*. Technical Bulletin Virginia. Agricultural Experiment Station 151: 1–95.
- Seibert CL, Negreiros, OC, Bueno RA, Emerich W, Moura-Netto BV, Marcondes MAP, Cesar SF, Guilanimon JR, Montagna RAA, Barreto JR, Oliveira MC, Godoi A.** (1975) Plano de manejo no Parque Estadual de Campos de Jordão. *Boletim Técnico do Instituto Florestal de São Paulo* 19: 1–153.
- Sekimoto S, Yokoo K, Kawamura Y, Honda D.** (2009) Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Olpidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, stramenopiles), a unicellular obligate endoparasite of *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyta). *Mycological Research* 112: 361–374.
- Seymour RL.** (1970) The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia* 19: 1–24.
- da Silva JB, Rocha JRS.** (2017) Oomycetes (Oomycota) from Maranhão State, Brazil. *Hoehnea* 44: 394–406.

- Shanor L.** (1940) Studies in the genus *Olpidiopsis*. III. Some observations on the host range of certain species. *Journal of the Elisha Mitchell Science Society* 55: 165–176.
- Shearer CA, Descals E, Kohlmeyer B, Kohlmeyer J, Marvanová L, Padgett D, Voglymayr H.** (2007) Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* 16: 49–67.
- Shin S, Kulatunga DCM, Dananjaya SHS, Nikapitiya C, Lee J, de Zoysa M.** (2017) *Saprolegnia parasitica* isolated from rainbow trout in Korea: characterization, anti-*Saprolegnia* activity and host pathogen interaction in zebrafish disease model. *Mycobiology* 4: 97–311.
- Silva JB, Rocha JRS.** (2017) Oomycetes (Oomycota) from Maranhão State, Brazil. *Hoehnea* 44: 394–406.
- Söderhäll K, Dick MW, Clark G, Fürst M, Constantinescu O.** (1991) Isolation of *Saprolegnia parasitica* from the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Aquaculture* 92: 121–125.
- Songe MM, Willems A, Wiik-Nielsen J, Thoen E, Evensen Ø, van West P, Skaarcorresponding I.** (2016) *Saprolegnia diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal Fish Diseases* 39: 343–352.
- Souza RPM, Souza VC, Polisel RT, Ivanauskas NM.** (2012) Estrutura e aspectos da regeneração natural de Floresta Ombrófila Mista no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, Brasil. *Hoehnea* 3: 387–407.
- Skoronski E, Gonçalves AFN, Melim EWH, de Aguiar AR, Libardo K, Fritzke W, Fabregat TEHP.** (2018) Evaluation of small-scale trout farming impact on water

quality in Santa Catarina State, Brazil. Latin American Journal of Aquatic Research 46: 981–988.

Sparrow Jr FK. (1960) Aquatic phycomycetes. 2^a ed., University of Michigan Press, Ann Arbor, EUA.

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.

Srivastava TC, Srivastava RC. (1977) *Dictyuchus anomalous* (Nagai), a new pathogen of freshwater teleosts. Current Science 46: 118.

Srivastava TC, Srivastava RC. (1978) Fungi associated with the diseases of freshwater fishes. Mycopathologia 63: 121–126.

Stamatakis A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30: 1312–1313.

Steciow MM, Lara E, Amandine Pillonel A, Pelizza SA, Eduardo A. 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.

Strittmatter M, Gachon CMM, Kupper FC. (2009) Ecology of lower Oomycetes. In: Lamour K, Kamoun S. (Eds.). Oomycete genetics and genomics. Diversity, interactions and research tools. Wiley Blackwell, New York, p 574.

Tabata YA, Rigolino MG, Tsukamoto e RY. (1999) Produção de lotes monossexofemininos triploides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. III – 135

Crescimento até idade de primeira maturação sexual. Boletim do Instituto de Pesca 25: 67–76.

Tabata YA, Portz L. (2004) Truticultura em clima tropical. *In*: Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N.(Eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, TecArt, Cap. 11, pp. 308–341.

Tabata YA, Portz L, Tsukamoto RY, Takahashi NS. (2011) Incubação de ovos de salmão do atlântico (*salmo salar*) landlocked em sistema de recirculação de água. Pesquisa & Tecnologia 2: 1–8.

Tahar A, Kennedy A, Fitzgerald RD, Clifford E, Rowan N. (2018) Monitoramento total da qualidade da água de uma fazenda tradicional de trutas arco-íris com escoamento. Peixes 3: 19–28.

Tavares-Dias M, de Moraes FR, Martins ML, Santana AE. (2002) Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (osteichthyes: cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. Boletim do Instituto da Pesca 28: 1–9.

Thines M. (2014) Phylogenetic and evolution of plant pathogenic oomycetes- a global overview. Plant pathology journal 138: 431–447.

Thines M, Kamoun S. (2010) Oomycete–plant coevolution: recent advances and future Prospects. Current Opinion in Plant Biology 13: 427–433.

Thoen E, Evensen Ø and Skaar I. (2011) Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. Journal Fish Disease 34: 601–608.

Thoen E, Vrålstad T, Rolén E, Kristensen R, Evensen Ø, Skaar I. (2015) *Saprolegnia* species in Norwegian salmon hatcheries: field survey identifies *S. diclina* sub-clade IIB as the dominating taxon. Diseases of Aquatic Organisms 114: 189–198.

- Toen E, Evensen O, Skaar I.** (2016) Factors influencing *Saprolegnia* spp. spore numbers in Norwegian Salmon hatcheries. *Journal of fish Diseases* 39: 657–665.
- Tkaczyk M.** (2020) *Phytophthium*: origin, differences and meaning in modern plant pathology. *Folia Forestalia Polonica* 62: 227–232.
- Torres DE, Mancilha IM.** (2020) Avaliação da viabilidade de microrganismos probióticos incorporados em ração de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 72: 2381–2386.
- 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.
- Trindade Jr OC, Rocha JRS.** (2018) Diversidade, abundância e frequência de oomycota, blastocladiomycota e chytridiomycota em lagoas de Teresina, Piauí. *Gaia Scientia* 12: 1–11.
- Utkhede RS, Lévesque CA, Dinh D.** (2009) *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 138–144.
- Uzuhashi S, Tojo M, Kakishima M.** (2010) Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51: 337–365.
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F.** (2015) Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of vetererunary Pharmacological and Therapeutics* 38: 417–428.
- Vegas-Ramirez MT, Moreno-Lafont MC, Valenzuela R, Cervantes-Olivares R, Aller-Gancedo JM, Fregeneda-Grandes JM, Damas-Aguilar JL, García-Flores V, López-Santiago R.** (2013) New records of Saprolegniaceae isolated

- from rainbow trout, from their eggs, and water in a fish farm from the State of Mexico. *Revista Mexicana de biodiversidad* 84: 637–649.
- Verma V.** (2008) Fungus disease in fish, diagnosis and treatment. *Veterinary World* 1: 62.
- Vollset KW.** (2019) Parasite induced mortality is context dependent in Atlantic salmon: insights from an individual-based model. *Scientific Reports* 9: 1–15.
- Walker CA, West PV.** (2007) Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* 21: 10–18.
- Watanabe T.** (1987) *Plectospira myriandra*, a Rediscovered Water Mold in Japanese Soil. *Mycologia* 79: 77–81.
- van West P.** (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20: 99–104.
- Willoughby LG.** (1970) Mycological aspects of a disease of young perch in Windermere. *Journal of Fish Biology* 2: 113–116.
- Willoughby LG.** (1977) An abbreviated life cycle in the salmonid fish *Saprolegnia*. *Transactions of the British Mycological Society* 69: 133–166.
- Willoughby LG.** (1997) *Achlya diffusa* (Fungi, Oomycota) from fishponds in Thailand. *Nova Hedwigia* 64: 467–471.
- Willoughby LG.** (2003) Diseases of freshwater fishes. *in* Tsui CKM, Hyde KD, (eds.). *Freshwater mycology*. Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 111–126.
- Willoughby LG, McGrory CB, Pickering AD.** (1983) Zoospore germination of *Saprolegnia* pathogenic to fish. *Transactions of the British Mycological Society* 80: 421–435.

- Willoughby LG, Pickering AD, Johnson HG.** (1984) Polycell-gel assay of water for spores of Saprolegniaceae (fungi), especially those of the *Saprolegnia* pathogen of fish. *Hydrobiologia* 114: 237–248.
- Willoughby LG, Roberts RJ.** (1992) Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *Journal of Fish Diseases* 15: 1–13.
- Willoughby LG, Roberts RJ, Chinabut S.** (1995) *Aphanomyces invaderis* sp. nov., the fungal pathogen of freshwater tropical fish affected by epizootic ulcerative syndrome. *Journal Fish Disease* 18: 273–275.
- Yadav MK, Pradhan KP, Sood N, Chaudhary DK, Verma KD, Chauhan UK, Punia P, Jena JK.** (2016) Innate immune response against an oomycete pathogen *Aphanomyces invadans* in common carp (*Cyprinus carpio*), a fish resistant to epizootic ulcerative syndrome. *Acta Tropica* 155: 71–76.
- Yang X, Zhao W, Hua C, Zheng X, Jing M, Li D, Govers F, Meijer HJG, Wang Y.** (2013) Chemotaxis and oospore formation in *Phytophthora sojae* are controlled by G-protein-coupled receptors with a phosphatidylinositol phosphate kinase domain. *Molecular Microbiology* 88: 382–394.
- Yang X, Tyler BM, Hong C.** (2017) An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* 8: 355–384.
- Zahran E, Risha E.** (2013) Protective role of adjuvant and potassium permanganate on oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Saprolegnia ferax*. *Springer Plus* 2: 94.
- Zaki MS, Fawzi OM, El Jwkey J.** (2008) Pathological and Biochemical Studies in *Tilapia nilotica* Infected with *Saprolegnia parasitica* and Treated with Potassium

Permanganate. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 3: 677–680.

Zaki MS, Fawazi OM. (2015) *Saprolegnia parasitica* in fish (Review). *Life Science Journal* 12: 156.

Zárate MI, Sánchez PC, Palomino CH, Smith DC. (2018) Caracterización de la crianza de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en la provincia de Chincheros, Apurímac, Perú. *Revista de investigação veterinária* 29: 1310–1314.

Zhang X, Zhai C, Hua C, Qiu M, Hao Y, Nie P, Ye W, Wang Y. (2016) PsHINT1, associated with the G-protein alpha subunit PsGPA1, is required for the chemotaxis and pathogenicity of *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant Pathology* 17: 272–285.

Zhao Y, Gozlan RE, Zhang C. (2014) Current state of freshwater fisheries in China. *In: Craig J. (Ed.). Freshwater Fisheries, Wiley-Blackwell, London, pp 221–229.*

8. ANEXOS

ANEXO 1

(Artigo publicado na Revista Phytotaxa 415(4): 208–216)



Article

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.415.4.5>

***Aphanomyces brasiliensis* sp. nov. (Verrucalvaceae, Saprolegniales): a new species from Brazilian Atlantic Rainforest areas**

CARMEN LIDIA AMORIM PIRES-ZOTTARELLI^{1,2}, DÉBORA R. S. COLOMBO¹, SARAH C. O. DA PAIXÃO¹, POLIANA O. VENTURA¹, MARCELA C. BORO¹ & ANA L. DE JESUS¹

¹ Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, CEP 04301-912, São Paulo, SP, Brazil. ²E-mail: zottarelli@uol.com.br

Abstract

In this study, *Aphanomyces brasiliensis* is proposed as a new species. It was collected from soil and water samples of a trout farming system located in Atlantic Rainforest areas, São Paulo State, Brazil. This species is mainly characterized by the presence of commonly short and unbranched oogonial stalks, antheridia usually androgynous and monoclinal with clavate, bell-shaped or cylindrical antheridial cells. We also collected *Aphanomyces helicoides*, *A. raphani* and *A. stellatus* from samples of submerged leaves, surface sediment and water in freshwater bodies. All species were isolated growing on cellulosic and/or keratinous substrates used as bait. Phylogenetic analysis of the ITS (rDNA) region showed that the new species and the other Brazilian isolates clustered within the *Aphanomyces* clade.

Keywords: diversity, Oomycota, Straminipila, taxonomy

Introduction

Aphanomyces de Bary is a monophyletic genus of oomycetes that can be either saprotrophic on various decaying debris or parasitic of plants and animals, in aquatic and terrestrial ecosystems. It has been previously assigned to Leptolegniaceae and Saprolegniaceae (Dick 2001, Johnson *et al.* 2002), but currently, molecular studies based on the ITS and LSU (rDNA) regions placed this genus in Verrucalvaceae, together with *Aquastella*, *Pachymetra*, *Phragmosporangium*, *Plectospira*, *Sommerstorffia* and *Verrucalvus* (Beakes *et al.* 2014, Beakes & Thines 2017, Rocha *et al.* 2018).

This genus has approximately 43 valid species (www.indexfungorum.org), being *Aphanomycesstellatus* de Bary the type species (Diéguez-Uribeondo *et al.* 2009). Recently, a potentially new species was described as a crayfish parasite in Eastern Finland (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2018). Diéguez-Uribeondo *et al.* (2009) analysed the ITS (rDNA) region of 12 *Aphanomyces* species and showed their distribution within three independent lineages: animal parasites, plant parasites, and saprotrophs or opportunistic parasites. Some studies (Saylor *et al.* 2010, Fisher *et al.* 2012, Czczuga *et al.* 2015) evidenced that saprotrophic species may behave as opportunistic pathogens with no host specialization.

The life cycle of *Aphanomyces* includes asexual and sexual stages. Animal parasitic species generally lack the sexual phase, being the asexual stage responsible for dispersion and host infection (Diéguez-Uribeondo *et al.* 2006, 2009). The zoosporangia are filamentous, isodiametric and undifferentiated from the hyphae. Primary zoospores are arranged in a single row within zoosporangium and are generally discharged by one apical pore, where they encyst and form a cluster that is a diagnostic feature of this genus (Johnson *et al.* 2002).

Our new species was isolated from soil and water samples of a trout farming system located in Brazilian Atlantic Rainforest areas and grew saprophytically on snake skin used as bait. Its main diagnostic feature is the presence of commonly short and unbranched oogonial stalks, and antheridia usually androgynous and monoclinal with clavate, bell-shaped or cylindrical antheridial cells. In addition, we isolated *Aphanomyces helicoides* Minden A. *raphani* J.B. Kendr. and *A. stellatus* from submerged leaves, surface sediment and water samples of freshwater bodies located in these areas and are also illustrated herein. The phylogenetic analysis of the ITS (rDNA) region showed that all the studied isolates are placed in the *Aphanomyces* clade.

Accepted by Kevin Hyde: 20 Aug. 2019; published: 2 Sept. 2019

Material & Methods

Sampling and laboratory analysis

Samples of soil and submerged leaves, surface sediment and water from freshwater bodies were collected in August/2016, February/2017, June/2017 and October/2017 at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, a group of conservation units situated in an Atlantic Rainforest area of São Paulo State, Brazil. Aliquots of sampled water (30 mL), submerged leaves (approx. 10g), surface sediments (15g), and soil (15g) with 30mL of the autoclaved reverse osmosis water, were plated and baited following

the baiting technique (Milanez 1989). Samples were incubated at room temperature (approx. 22° C) for five days. After incubation, the baits were observed under the microscope and the specimens yielding visible growth of *Aphanomyces* were isolated and purified onto MP₅ solid culture medium (Beneke & Rogers 1962). An additional specimen of *Aphanomyces* isolated from water samples of a trout farming system at “Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento” (UPD), Campos do Jordão, São Paulo State, in March/2017, was also studied using the same methodology. Asexual and sexual structures were characterized and measured in water cultures ($n=50$), and morphological identification was according to Scott (1961) and Johnson *et al.* (2002). The specimens were deposited at the CCIBt culture collection (“Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica”, São Paulo, SP, Brazil). A dried culture of the new species obtained as described by Wu *et al.* (2004) was used as a voucher specimen and deposited in the Herbarium SP.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Each isolate of *Aphanomyces* was cultivated in three Erlenmeyers® (250 mL) containing 30 mL of MP₅ liquid medium. After incubation for 5-10 d at approximately 22 °C in the laboratory, the mycelium was harvested by centrifugation at 13000 rpm for 15 min in order to obtain mycelial pellets. The mycelial pellets of the three replicates were aseptically combined in order to obtain enough biomass for DNA extraction. The supernatants were discarded and 1 mL of sterile reverse-osmosis water was added to the tubes followed by vortexing at 2500 rpm. The tubes were again centrifuged and the supernatant discarded. Pellets were treated according to the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). The partial LSU and ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) regions were amplified using the primers LR0R/ LR6-O (Riethmüller *et al.* 2002) and UN-up18S42 and UN-lo28S22 (Robideau *et al.* 2011). The PCR amplification was performed according to the conditions described in Marano *et al.* (2014). Amplicons were purified using the protocol described in Schmitz & Riesner (2006). Sequencing was performed in an ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™), with the same primers used for the PCR. Assembly of contigs and correction of ambiguous bases were performed manually with Sequencher 4.1.4. The sequences were compared against BLASTn.

Phylogenetic analysis

For phylogenetic reconstruction, we selected the ITS rDNA sequences of *Aphanomyces* obtained in this study (Table 1) and other 52 sequences of the genus deposited at GenBank, using *Saprolegnia milanezii* Pires-Zottarelli & Rocha as the outgroup. Sequences were aligned using MAFFT 7 with default settings (Kazutaka & Daron 2013) followed by manual editing and exclusion of unambiguously aligned regions. The best-fitting model of evolution was selected using the Akaike Information Criterion in jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) phylogenies were constructed using RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) and MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) over CIPRES Science Gateway platform (<https://www.phylo.org/>). We performed the ML analysis with 1000 bootstrap (bs) replicates and the BI using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methodology to calculate posterior probabilities (pp). The program was run for five million generations and the first 10% of the iterations were discarded as burn-in and sampled every 1000th iterations from the remaining chain.

Results

Isolates and phylogenetic placement

Thirty-nine specimens of *Aphanomyces* were isolated from 180 samples of soil, submerged leaves, surface sediment and water of freshwater bodies of “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”. Among them, five isolates belong to *Aphanomyces helicoides*, one to *A. raphani*, nine to *A. stellatus* (Fig. 1) and two to the new species *Aphanomyces brasiliensis* (Fig. 2). Based on the molecular data, the additional isolate of *Aphanomyces* obtained from water samples of a trout farming system in Campos do Jordão, also belongs to the new species. All species grew saprotrophically on the substrates used as baits (Table 1).

TABLE 1. Taxa, strain/voucher, origin and GenBank accession number of the isolates of *Aphanomyces* sequenced in this study

Taxa	Strain/Voucher		Isolate Origin		GenBank Accession Number	
	Number	Samples	Substrate/bait	Collection area	ITS	LSU
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	CCIBt 4359	Soil	Snakeskin	“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”	X	X
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	CPZ14	Sediment of freshwater body	Snakeskin	“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”	X	X
<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	SCP128	Trout farming system’s water	Snakeskin	“Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento” (UPD)	X	X
<i>Aphanomyces helicoides</i>	CCIBt 4331	Submerged leaves	Onion skin	“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”	X	X
<i>Aphanomyces helicoides</i>	CPZ100	Sediment of water body	Snakeskin	“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”	X	X
<i>Aphanomyces raphani</i>	CCIBt 4409	Freshwater	Corn leaves	“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”	X	X
<i>Aphanomyces stellatus</i>	CCIBt 4305	Sediment of water body	Snakeskin	“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”	X	X

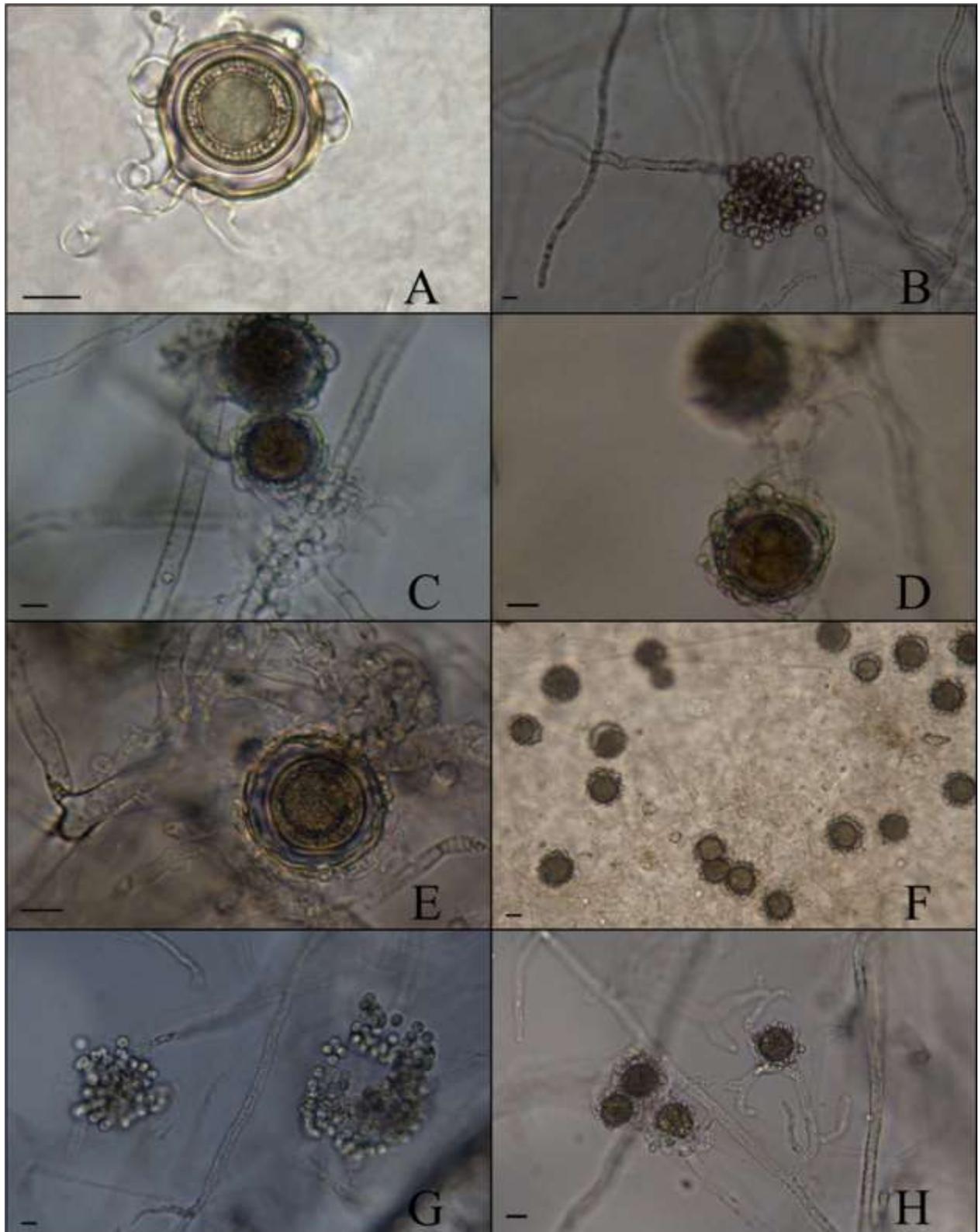


FIGURE 1 A–H. *Aphanomyces helicoides*. A. Oogonium, subcentric oospore and antheridia. **B–F.** *Aphanomyces raphanii*. B. Zoospore discharge. C. Branched and irregular hyphae near the oogonia. D. Antheridia wrapping around the oogonia. E. Oogonium with irregular inner wall, oospore and antheridia. **F–H.** *Aphanomyces stellatus*. F. Oogonia on snake skin. G. Zoospore discharge. H. Ornamented oogonia with oospheres. Bars=10 μ m.

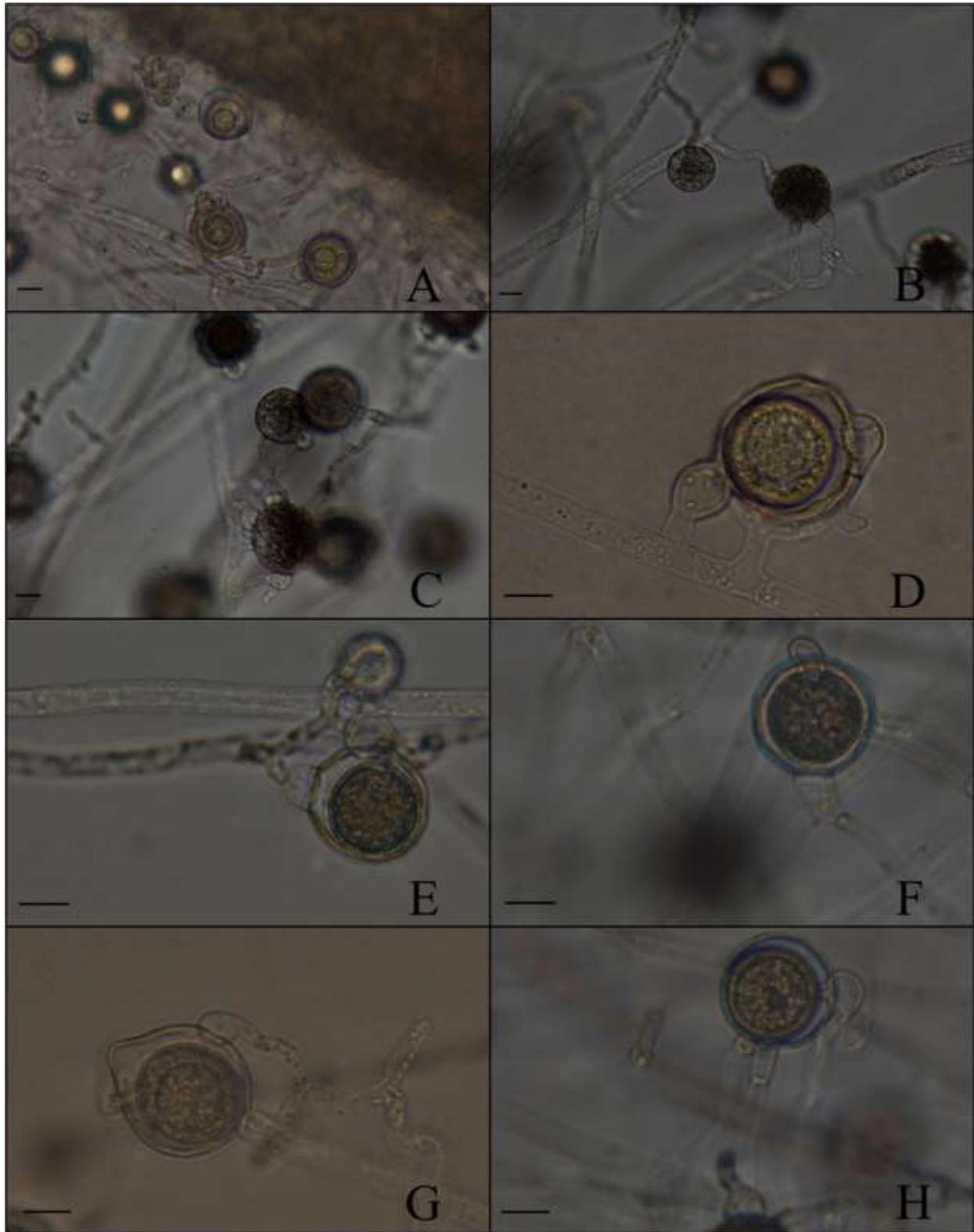


FIGURE 2. A–H. *Aphanomyces brasiliensis* sp. nov. A. Zoospores and oogonia on snake skin. B–C. Androgynous, monoclinal and diclinal antheridia attached to young oogonia. D. Oogonium with oospore, androgynous and monoclinal sessile antheridia. E. Oogonium with oosphere and bell-shaped antheridial cell. F. Papillate oogonia. G. Oogonium with subcentric oospore and androgynous antheridium. H. Oogonium with a young oospore and a fertilization tube. Bars=10 μ m.

The phylogenetic analysis of the ITS rDNA region (Fig. 3) showed that the 19 valid species analysed belong to the *Aphanomyces* clade. *Aphanomyces helicoides* was placed in the saprotrophic or opportunistic lineage, whereas *A. raphani* in the plant parasitic lineage, however, this latter species was isolated as saprotroph from a freshwater sample in the study area (Table 1). Although our analysis did not resolve the position of *Aphanomyces stellatus*, this species appears to be more closely related to the saprotrophic/opportunistic and plant parasitic lineages. The new species *Aphanomyces brasiliensis* clustered with high support (100% bs and 1.00 pp) with *A. sinensis* (84% similarity using Blastn), a species described as animal parasite. The main morphological features of these two species are shown in Table 2.

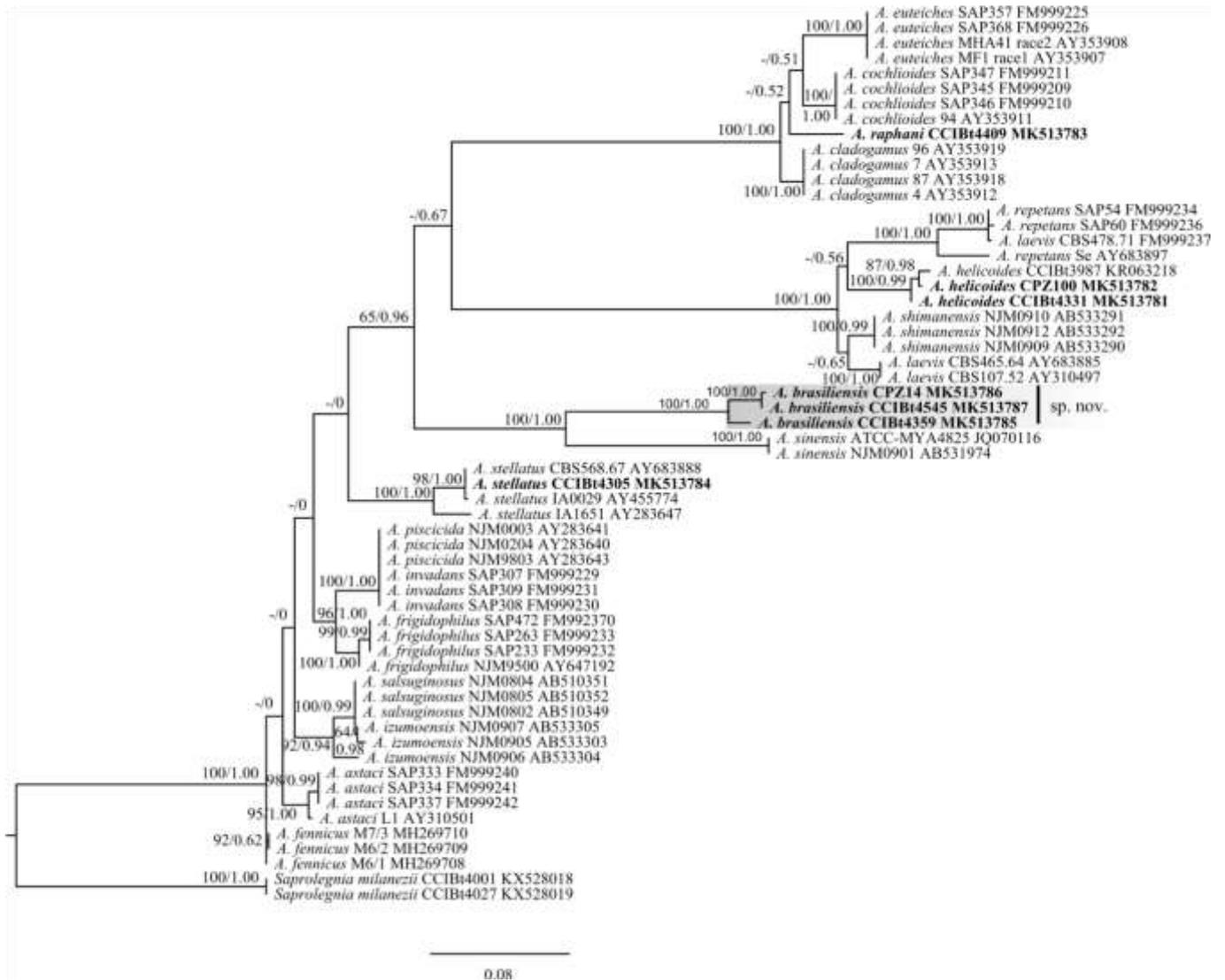


FIGURE 3. Phylogram generated by Maximum likelihood based on the analysis of the ITS rDNA region of 57 sequences of *Aphanomyces*. Maximum likelihood bootstrap support values > 50% and Bayesian posterior probability values > 0.50 are labelled numerically. The clades that were not recovered in the Bayesian tree are indicated with (0). The scale bar indicates the average number of substitutions per site. Sequences from this study are indicated in boldface.

TABLE 2. Comparison of the main morphological features between *Aphanomyces brasiliensis* and *A. sinensis*. *Based on Takuma *et al.* (2011).

Morphological features	<i>Aphanomyces brasiliensis</i>	<i>Aphanomyces sinensis</i> *
Zoosporangium shape	Isodiametric	isodiametric
Encysted primary zoospores	7.5–10 µm diam	8–12 µm diam
Oogonium shape	spherical, sometimes obpyriform	spherical or sub-spherical, rarely pyriform
Oogonium size	22.5–32.5 µm diam	18–25 µm diam
Oogonial wall	smooth, one papillae sometimes present	smooth
Oospore size	15–25 µm diam	15–22 µm diam
Oospore type	Subcentric	centric to subcentric
Clear nuclear spot in the oospore	not observed	observed
Antheridial origin	androgynous and monoclinal, sometimes diclinous or sessile	diclinous, rarely monoclinal and androgynous
Antheridial cell	clavate, bell-shaped or cylindrical	vermiform, often irregular

Taxonomy

Aphanomyces brasiliensis C.L.A Pires-Zottarelli & A.L. Jesus, sp. nov. (Fig. 2A–H)

MycoBank number: MB 832404

Holotype:—BRAZIL. São Paulo: Iguape, “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, isolated from soil samples, on snake skin used as bait, 25 October 2017, SP498604 (dried culture), **Ex-type** CCIBt4359.

Monoecious. Mycelium limited on *Sorghum* seeds; hyphae slender, sparingly branched, delicate. Sporangia scarce, filamentous, isodiametric and undifferentiated from the vegetative hyphae. Spore discharge and behaviour achlyoid; spore cluster persisting at the exit pore; encysted primary cysts 7.5–10 µm diam. Gemmae absent. Oogonia abundant, readily formed; usually lateral, but sometimes terminal, intercalary or sessile, spherical, 22.5–32.5 µm diam., or sometimes obpyriform. Oogonial wall commonly smooth, sometimes with one papillae; inner wall becoming irregular with the age in some oogonia. Oogonial stalks simple, commonly short, straight, 1/4–2 times the diameter of the oogonium. Oospheres generally maturing. Oospores subcentric, spherical, 15–25 µm diam.; 1, rarely 2 per oogonium; germination not observed. Antheridial branches androgynous and monoclinal, sometimes diclinous or sessile;

unbranched; persisting, 1 to 3 per oogonium. Antheridial cell clavate, bell-shaped or cylindrical; simple, attached apically or laterally to the oogonium; fertilization tube present, persisting.

Etymology:—“*brasiliensis*” refers to the country of origin of the isolates.

Additional specimens examined—BRAZIL. São Paulo: Campos do Jordão, from water of a trout farming system, on snake skin used as bait, 07 March 2017 (CCIBt4545).

Notes:—This species was isolated from the original sample on snake skin. It forms a limited two-week colony of 1 cm diameter on *Sorghum* seeds. The zoosporangia were readily formed and no gemmae were produced. On both substrates, the development of sexual structures was usually abundant after three to four days at approximately 22°C.

Discussion

In this paper, we described *Aphanomyces brasiliensis* sp. nov., based on morphological and phylogenetic analyses. In addition, other species found in the studied areas are illustrated herein. All species were isolated from aquatic and terrestrial ecosystems and grew saprotrophically on the substrates used as baits. In Brazil, *Aphanomyces helicoides* and *A. stellatus* are commonly registered as saprotrophs on keratinous substrates (Steciow *et al.* 2012, Miranda & PiresZottarelli 2012, Jesus *et al.* 2013). *Aphanomyces raphani* was first registered as a pathogen of *raphanus sativus* L. (Mendes *et al.* 1998) and is herein documented for the second time in Brazil.

Our phylogenetic analysis showed that the new species clustered with *Aphanomyces sinensis*, a pathogen species isolated from turtle in Japan by Takuma *et al.* (2011), and together with *A. stellatus*, are in particular clusters within the *Aphanomyces* clade. We could not clearly resolve the placement of these two species in the lineages proposed by Diéguez-Uribeondo *et al.* (2009), although they seem to be more related to the saprotrophic/opportunistic and plant parasitic lineages. Our results showed that *A. helicoides* and *A. raphani* fall into the saprotrophic/opportunistic and the plant parasitic lineages, respectively, as previously demonstrated by Diéguez-Uribeondo *et al.* (2009). In the present study, however, these latter species were isolated as saprotrophs on baits. Our results indicate that given the scarce number of *Aphanomyces* sequences currently available at GenBank, it is impossible to discuss the placement of species within lineages. However, we were able to confirm the opportunistic nature of most *Aphanomyces* species, as some authors have already pointed out (Royo *et al.* 2004, Saylor *et al.* 2010, Fisher *et al.* 2012, Czezuguet *et al.* 2015). This study helps to increase our knowledge about the occurrence and distribution of *Aphanomyces* species and contributes to the oomycete diversity by describing a species new to science.

Acknowledgments

We thank “Instituto Florestal” and “Instituto de Pesca” for the permission given to collect samples in the studied areas. We also wish to thank FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”) for the financial support given to C.L.A. Pires-Zotarelli (Process N°. 2016/11146-4), P.O. Ventura (Process N° 2017/12481-4), D.R.S. Colombo (Process N° 2018/05602-2) and S.C.O. da Paixão (Process N°

2016/18787-5). CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is also acknowledged for the grant given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process N° 304091/2018-9).

References

- Beakes, G.W., Honda, D. & Thines, M. (2014) Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *In: McLaughlin, D.J. & Spatafora, J.W. (Eds.) the Mycota VIII Part A*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 39–97.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_3
- Beakes, G.W. & Thines, M. (2017) Hyphochytriomycota and Oomycota. *In: Archibald, J., Simpson, A. & Slamovits, C. (Eds.) Handbook of the Protists*. Springer International Publishing, Cham, pp. 435–505.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_26
- Beneke, E.S. & Rogers, L. (1962) Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Paraná, Brazil. *rickia*1: 181–193.
- Czeczuga, B., Czeczuga-Semeniuk, E. & Semeniuk-Grell, A. (2015) Ecological diversity and economical importance of species from *Aphanomyces* genus. *African Journal of Agricultural research* 10: 4356–4363.
<https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9736>
- Dick, M.W. (2001) *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 670 pp.
<https://doi.org/10.1007/978-94-015-9733-3>
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L., Dykova, I., Gelder, S.R., Hentonen, P., Jiravanichpaisal, P., Lom, J. & Söderhäll, K. (2006) Pathogens, parasites and ectocommensals. *In: Atlas of crayfish in Europe: distribution and diseases. Publications Scientifiques du Muséum national d’Histoire Naturelle. Patrimoines Naturels* 64: 135–155.
- Diéguez-Uribeondo, J., García, M.A., Cerenius, L., Kozúbiková, E., Ballesteros, I., Windels, C., Weiland, J., Kator, H., Sorderhall, K. & Martín, M.P. (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* 46: 365–376.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.004>
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L. & Gurr, S.J. (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186–194.
<https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Jesus, A.L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2013) Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: novas citações. *Hoehnea* 40 (1):167–180.
<https://doi.org/10.1590/S2236-89062013000100009>

- Johnson, T.W. Jr., Seymour, R.L. & Padgett, D.E. (2002) Biology and systematics of Saprolegniaceae. Available from: <http://dl.uncw.edu/digilib/Biology/Fungi/Taxonomy%20and%20Systematics/Padgett%20Book/Preface.pdf> (accessed 28 January 2019).
- Kazutaka, K. & Daron, M. (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Marano, A.V., Jesus, A.L., de Souza, J.I., Leão, E.M., James, T.Y., Jerônimo, G.H., de Cock, A.W.A.W. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2014) A new combination in *Phytophthium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5: 510–522. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/5/4/3>
- Mendes, M.A.S., Silva, V.L., Dianese, J.C., Ferreira, M.A.S.V., Santos, C.E.N., Gomes Neto, E. & Urben, A.F. (Eds.) (1998) *Fungos em plantas no Brasil*. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 569 pp.
- Milanez, A.I. (1989) Fungos de águas continentais. In: Fidalgo, O. & Bononi, V.L. (Eds.) *técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 17–20.
- Miranda, M.L. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2012) Oomicetos do Parque Estadual da Serra da Cantareira, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea* 39: 95–112. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062012000100005>
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2: 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94: 834–849. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833177>
- Robideau, G.P., de Cock, A.W.A.M., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C.H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B. & Lévesque, A.C. (2011) DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular and Ecological resources* 11: 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Rocha, S.C.O., Lopes-Lastra, C.C., Marano, A.V., de Souza, J.I., Rueda-Páramo, M.E. & Pires-Zottarelli, C.L.A. (2018) New phylogenetic insights into Saprolegniales (Oomycota, Straminipila) based upon studies of specimens isolated from Brazil and Argentina. *Mycological Progress* 17: 691–700. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1381-x>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61 (3): 539–542.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

- Royo, F., Andersson, G., Bangyeekhun, E., Múzquiz, J.L., Söderhäll, K. & Cerenius, L. (2004) Physiological and genetic characterization of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. *Veterinary Microbiology* 104: 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.012>
- Saylor, R.K., Miller, D.L., Vandersea, M.W., Bevelhimer, M.S., Schofield, P.J. & Bennett, W.A. (2010) Epizootic ulcerative syndrome caused by *Aphanomyces invadans* in captive bullseye snakehead *Channa marulius* collected from south Florida, USA. *Diseases of Aquatic organisms* 88: 169–175. <https://doi.org/10.3354/dao02158>
- Schmitz, A. & Riesner, D. (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* 354: 311–313.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.014>
- Scott, W.W. (1961) A revision of the genus *Aphanomyces*. *technical Bulletin Virginia Agricultural Experiment Station* 151: 1–95.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30 (9): 1312–1313.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Steciow, M.M., Milanez, A.I., Pires-Zottarelli, C.L.A., Marano, A.V., Letcher, P.M. & Vélez, C.G. (2012) Zoosporic true fungi, heterotrophic straminipiles and plasmodiophorids: status of knowledge in South America. *Darwiniana* 50: 25–32. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0011-67932012000100002&lng=es&tlng=es (Accessed 2 Sept. 2019)
- Takuma, D., Sano, A., Wada, S., Kurata, O. & Hatai, K. (2011) *Aphanomyces sinensis* sp. nov., isolated from juvenile soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*, in Japan. *Mycoscience* 52: 119–131.
<https://doi.org/10.1007/S10267-010-0082-3>
- Viljamaa-Dirks, S. & Heinikainen, S. (2018) A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *Journal of Fish Diseases* 42: 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>
- Wu, Q., Thiers, B.M. & Pfister, D.H. (2004) Preparation, preservation and use of fungal specimens in herbaria. In: Muller, G.M., Bills, G.F. & Foster, M.S. (Eds.) *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 23–36. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50005-2>

ANEXO 2

(Artigo enviado para Revista Fungal Systematic Evolution (FUSE))

**New records of *Phytopythium* (Peronosporales s.l., Oomycota) from Brazilian
Atlantic Rainforest: morphological and molecular studies**

Surveys were conducted in two Brazilian Atlantic Rainforest areas (“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” and a trout farm in Campos do Jordão city). Twenty- one isolates of *Phytopythium* from various substrates were recorded. The isolates were identified based on their morphology and molecular gene markers (ITS and LSU subunits of nuc rDNA). Four species of *Phytopythium* were identified: *Phytopythium chamaehyphon*, *Pp. litorale*, *Pp. palingenes* and *Pp. vexans*. *Phytopythium chamaehyphon* and *Pp. litorale*, which are new records for Brazil, are briefly described and discussed. The phylogenetic analyses corroborate the position of these species within the clades of *Phytopythium*.

Keywords: diversity, fungus-like organisms, phylogeny, Straminipila

INTRODUCTION

Phytopythium was described by Bala *et al.* (2010) based on the phylogenetic analysis of the LSU subunits of the nuclear rDNA region of *Pythium* and *Phytophthora*. Their species were previously classified within the clade K of *Pythium* by Levesque and de Cock (2004). In 2015, species from this clade were formally transferred to *Phytopythium* by de Cock and collaborators, based on phylogenetic analyses of ITS, LSU subunits of the nuc rDNA and the mDNA (COI) regions (de Cock *et al.* 2015). Currently, *Phytopythium* includes 23 valid species (indexfungorum.org) distributed among three clades, with the last described species *Pp. nanjingense* (Chen *et al.* 2019a).

Morphological features include ovoid to globose sporangia, papillate or non-papillate, internal zoosporangial proliferation similar to *Phytophthora* and a typical *Pythium*-type zoospore discharge. The exception to the rule is *Phytopythium kandeliae*, in which the zoospores develop in both the sporangium and the external vesicle simultaneously and are released after the rupture of the vesicle (Marano *et al.* 2014, Baten *et al.* 2015, Jesus *et al.* 2016, Bennett *et al.* 2017).

The genus *Phytopythium* is currently classified into Peronosporaceae *s.l.*, Peronosporales *s.l.*, Peronosporomycetes class, Oomycota phylum of the Kingdom Straminipila (Beakes & Thines 2017, Wijayawardene *et al.* 2020). Species can be either saprophytes in various types of substrates or parasites of plant roots in aquatic and/or terrestrial ecosystems, some of them of economic importance (Baten *et al.* 2015, Bouket *et al.* 2016, Jesus *et al.* 2016, Benfradj *et al.* 2017, Gonçalves *et al.* 2017, Chen *et al.* 2019b, Tkaczyk 2020). In Brazil, five species of *Phytopythium* have been recorded up to date: *Pp. helicoides*, *Pp. indigoferae*, *Pp. kandeliae*, *Pp. palingenes*, and *Pp. vexans*, which were identified using morphological and/or molecular characters (Milanez *et al.* 2007, Marano *et al.* 2014, Jesus *et al.* 2016, Gonçalves *et al.* 2017). In this study, twenty-one *Phytopythium* isolates distributed within four species were isolated from samples of soil, water, surface sediments and submerged leaves collected in Brazilian Atlantic Rainforest areas, São Paulo state. *Phytopythium. chamaehyphon* and *Pp. litorale* are recorded for the first time in Brazil, and are described, illustrated and discussed herein. The ITS and LSU rDNA sequences of these isolates were deposited in GenBank.

MATERIALS AND METHODS

Isolation

Samples of water, soil, submerged leaves, and surface sediments were collected in several areas of the Atlantic Rainforest, São Paulo state, Brazil (“Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins” - 24°31'35.3"S, 47°17'12.3"W- and a trout farm in Campos do Jordão city - 22°46'56.6"S, 45°36'05.5"W), from 2016 to 2017.

Soil, submerged leaves, and surface sediments were diluted in 30mL of sterile distilled water, and along with water samples collected from freshwater bodies and rainbow trout farming tanks, were plated and baited using the multiple baiting method (Milanez 1989). Plates were incubated for 4–7 days in an acclimatized room (~22°C). After this period, the baits (*Sorghum* spp. seeds, onion skin, corn leaves, and snake skin) were observed under a Leica DMLB2 compound microscope. *Phytophthora* isolates were purified onto CMA (cornmeal agar) medium (Fuller & Jaworski 1987), with 0.5g L of streptomycin sulphate and 0.5g L penicillin G.

Species were identified morphologically based on the original descriptions using a Leica MC170 HD camera with Leica Qwin 3.1 software. The representative specimens were incorporated into the CCIBt culture collection (“Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica”) and selected for molecular study.

Molecular analyses

Mycelium biomass from each specimen was grown for 3–5 days in falcon tubes containing 20 mL of MP₅ (4 g maltose, 1 g peptone, and 1 L distilled water) liquid medium at room temperature (~22 °C). Biomass was transferred to Eppendorf® tubes,

washed with sterile water and centrifuged at 13000 rpm for 15min to obtain pellets. The DNA extraction was performed according to the protocol described in the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®). The ITS1–5.8S–ITS2 and LSU regions were amplified using the primers UN–up18S42 and UN–1o28S22 (Robideau *et al.* 2011) and LR0R/LR6-O, respectively (Riethmüller *et al.* 2002). DNA was amplified with JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich®) for a final volume of 25 µL, using the cycle described by Marano *et al.* (2014). Amplicons were purified manually according to the protocol of Schmitz & Riesner (2006). The sequencing was performed by Macrogen Inc. (Seoul Korea). Assembly of contigs and correction of ambiguous bases were manually edited using “Sequencher™ version 4.1.4”. All sequences were deposited in the GenBank database (Table 1).

Phylogenetic analyses

The datasets with ITS and LSU nuc rDNA sequences of 51 *Phytophthium* isolates were used for the phylogenetic analyses, with *Pythium takayamanum* CBS122.492/CCIBt4040 as outgroup. The dataset was aligned with MAFFT 7 program, with default settings (Kato *et al.* 2017) and adjusted manually in BioEdit (Hall 1999). The best-fitting model of evolution was selected using the Akaike Information Criterion in jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). The dataset was concatenated using SequenceMatrix 1.8 (Vaidya *et al.* 2010), resulting in a final length of 2.140 bp. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) phylogenies were constructed using RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) and MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) over CIPRES Science Gateway platform (<https://www.phylo.org/>). The ML analysis was performed with 1.000 bootstraps (bs) replicates using the GTRGAMMAI model. The BI used the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methodology to calculate posterior

159

probabilities (pp). The program was run for five million generations, and the first 10% of the iterations were discarded as burn-in and sampled every 1000th iterations from the remainder.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty-one specimens of *Phytopythium* were isolated from 180 samples of soil, submerged leaves, surface sediments, and freshwater collected at “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, as well as from 132 freshwater samples of the trout farm. Among them, seven isolates belonged to *Phytopythium chamaehyphon* (Figs 1–4), eight to *Pp. palingenes* (Figs 5–8), two to *Pp. litorale* (Figs 9–10), and four to *Pp. vexans* (Figs 11–12). All species grew as saprophytes on the substrates used as baits. *Phytopythium chamaehyphon* and *Pp. litorale* are recorded for the first time in Brazil.

Morphology

TAXONOMY

PERONOSPORALES s.l.

PERONOSPORACEAE s.l.

Phytopythium chamaehyphon (Sideris) Abad, de Cock, Bala, Robideau, A.M. Lodhi & Lévesque *Persoonia* 34: 36. 2014. – Figs 1–4

B a s i o n y m . – *Pythium chamaehyphon* Sideris, *Mycologia* 24 (1): 33. 1932

– *Ovatisporangium chamaehyphon* (Sideris) Uzuhashi, Tojo & Kakish., *Mycoscience* 51 (5): 360. 2010

Description. – Mycelium well-developed on cornmeal agar with low aerial mycelium. Appressoria sickle shaped. Sporangia globose, 17–36 µm diameter, sometimes subglobose; lateral and intercalary; proliferating internally; encysted zoospores spherical, 10 µm diameter, discharge tubes differentiated into an evanescent vesicle. Sexual structures not observed.

Material examined. **BRAZIL**, São Paulo, Iguape, “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, isolated from freshwater samples, on corn leaves and *Sorghum* spp. seeds used as bait, isolated from surface sediments and submerged leaves, on *Sorghum* spp. seeds used as bait, 13 Feb 2017; isolated from surface sediments, on *Sorghum* spp. seeds used as bait, 24 Jun 2017; CLA Pires-Zottarelli and AL Jesus *s.n.* GenBank (CPZ68): ITS=MT620967; LSU=MT612335, (CCIBt4338): ITS=MT620968; LSU=MT612336, (CCIBt4407): ITS=MT620969; LSU=MT612337.

Notes. – The isolates presented only asexual structures. The species was identified based on the phylogenetic position of the specimens. This is the first record of the species in Brazil.

Phytophthium palingenes (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lohdi & Lévesque, *Persoonia* 34: 37. 2014. – Figs 5–8.

Basionym. – *Pythium palingenes* Drechsler, *Journal of the Washington Academy of Sciences* 20: 416. 1930.

Material examined. **BRAZIL**, São Paulo, Iguape, “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, isolated from freshwater and soil samples, on *Sorghum* spp. seeds used as bait; isolated from submerged leaves, on *Sorghum* spp. seeds, onion skin, and snakeskin, 31 Oct 2017; CLA Pires-Zottarelli and AL Jesus *s.n.*

GenBank (CCIBt4428): ITS=MT620973; LSU=MT612341, (CCIBt4397):
ITS=MT620974; LSU=MT612342.

N o t e s . – The characteristics of our isolates are in agreement with the original description of Drechsler (1930, 1941). Their main features include oogonium with antheridia wrapping around the oogonialstalk and cylindrical and irregular antheridium cells longitudinally or apically applied to the oogonium (van der Plaats-Niterink 1981). Recently, Jesus *et al.* (2016) isolated this species from freshwater and soil samples in an area of Atlantic Rainforest and its sequence was included in phylogenetic analysis and deposited in the GenBank database.

Phytophthium litorale (Nechw.) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, *Persoonia* 34: 37. 2014.– Figs 9–10

B a s i o n y m . – *Pythium litorale* Nechw., *FEMS Microbiology Letters* 255: 99. 2006
– *Ovatisporangium litorale* (Nechw.) Uzuhashi, Tojo & Kakish., *Mycoscience* 51 (5):
360. 2010

D e s c r i p t i o n . – Mycelium well-developed on cornmeal agar. Delicate hyaline hyphae with septa present in old cultures. Sporangia terminal, sometimes intercalary, subglobose, and ovoid, 22.0–42.0 × 14.0–28.0 µm, sometimes catenulate up to seven sporangia; proliferating internally; encysted zoospores spherical, 7.5–12.5 µm diameter, discharge tubes apical, differentiated into an evanescent vesicle. Sexual structures not observed.

M a t e r i a l e x a m i n e d . **BRAZIL**, São Paulo, Campos do Jordão, particular trout farm, isolated from freshwater samples collected at the outflow of the tank system , on *Sorghum* spp. seeds used as bait, 29 Nov 2016; isolated from

freshwater samples collected in a tank with juvenile fishes, on *Sorghum* spp. seeds used as bait, 07 Mar 2017; SCO da Paixão and CLA Pires-Zottarelli *s.n.* GenBank (CCIBt4659): ITS=MT620970; LSU=MT612338, (SCP82): ITS=MT620972; LSU=MT612340.

Notes. – The isolates only developed asexual structures and therefore, were identified based solely on the phylogenetic position of the specimens. This is the first record of the species in Brazil.

Phytopythium vexans (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, A.M. Lodhi & Lévesque, *Persoonia* 34: 37. 2014. – Figs 11–12

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

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

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

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

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

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

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

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

Material examined. **BRAZIL**, São Paulo: Iguape, “Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins”, isolated from soil samples, on *Sorghum* spp. seeds and snakeskin used as bait, 13 Feb 2017; on snakeskin and onion skin used as

bait, 31 Oct 2017; CLA Pires-Zottarelli and AL Jesus *s.n.* GenBank (CCIBt4398): ITS=MT620975; LSU=MT612343, (CCIBt4383): ITS=MT620976; LSU=MT612344.

Notes. –In Brazil, *P. vexans* is commonly found both as a saprophyte in aquatic and terrestrial environments and a phytopathogen (Carvalho 1965, Pires-Zottarelli 1999, Baptista *et al.* 2004, Jesus *et al.* 2016, Gonçalves *et al.* 2017). In this study, the isolates recovered from soil samples showed characteristics that are in agreement with the description of van der Plaats-Niterink (1981), as well as with isolates of this species previously recorded in Brazil (Jesus *et al.* 2016, Gonçalves *et al.* 2017).

Phylogeny

The phylogenetic analysis of the ITS and LSU rDNA regions (Fig. 13) showed that the four species of *Phytopythium* are distributed in three clades with high support (100% bs and 1.00 pp) and confirmed the morphological identification of *Pp. palingenes* and *Pp. vexans*. Also, *Pp. litorale* was placed in clade I with high support (100% bs and 1.00 pp) together with other isolates of the species, including some homothallic isolates identified by Dervis *et al.* (2020) (sequences Dyrbkr01 and Dyrbkr02). *Phytopythium chamaeheyphon* and *Pp. palingenes* were also highly supported (100% bs and 1.00 pp) together with other isolates of the species in clade II. *Phytopythium vexans* was placed in clade III (100% bs and 1.00 pp), and appeared as closely related to *Pp. amazonianum* and *Pp. cucurbitacearum*.

DISCUSSION

In this paper, we recorded *Phytophthium chamaehyphon* and *Pp. litorale* for the first time in Brazil, which are described based on morphological and phylogenetic analyses, and illustrated *Pp. palingenes* and *Pp. vexans* isolated from the studied areas. Although all species have been registered as plant pathogens worldwide (Sideris 1932, Carvalho 1965, van der Plaats-Niterink 1981, Mcleod *et al.* 2009, Santoso *et al.* 2015, Gonçalves *et al.* 2017), in the present study, they were isolated as saprophytes from aquatic and terrestrial ecosystems.

Two isolates of *Pp. litorale* (sequences CCIBt4659 and SCP82) were recorded in the present study. This species was first described from coastal soils in Germany (Nechwatal & Mengden 2006), with subsequent records in South Africa, Iran, and South Korea (Mcleod *et al.* 2009, Bouket *et al.* 2016, Nam & Choi 2019). Our sequences of *Pp. litorale* are related to *Pp. citricium* and *Pp. delawarensis* and are grouped in Clade I. Although previously studied isolates of *Pp. litorale* did not present sexual structures, recently Dervis *et al.* (2020) observed sexual structures in a pathogenic isolate from plane trees (*Platanus orientalis* L.) in Turkey.

The phylogenetic placement of *Phytophthium chamaehyphon* (sequences CCIBt4338, CCIBt4338 and CPZ68) in clade II, together with other sequences of the species, allowed its identification since the sexual reproduction was not observed. This species was described as a pathogen in *Carica papaya* L. (Sideris 1932), and sexual reproduction was only observed in the original host. Our isolates were found as decomposers on cellulosic substrates.

Phytophthium vexans has been commonly isolated as a saprophyte or plant parasite around the world (Carvalho 1965, van der Plaats-Niterink 1981, Spies *et al.*

2011, Santoso *et al.* 2015, Jesus *et al.* 2016, Gonçalves *et al.* 2017, Rodriguez-Padrón *et al.* 2018, Thao *et al.* 2020). Our isolates (sequences CCIBt4383 and CCIBt4398) were grouped with sequences of other isolates of *Pp. vexans*, *Pp. amazonianum* and *Pp. cucurbitacearum* available at GenBank, placing them in two subclades. The placement of isolates of *Phytophthium vexans* in different subclades is in agreement with the previous study of Spies *et al.* (2011), who mentioned the complexity of clade III, with strains of *Pp. vexans* distributed among several subclades, together with *Pp. cucurbitacearum* (invalid taxon), *Pp. amazonianum* and *Pp. indigoferae*. Although *Phytophthium amazonianum* has not been formally described, it has been cited in literature by Robideau *et al.* (2011) and Fuentes *et al.* (2018), who recorded this species as pathogenic on *Persea americana* in Mexico. The sequences of *Pp. indigoferae*, which is a species with filamentous zoosporangia (de Cock *et al.* 2015), seem to be misidentified and therefore, has not been included in our analyses. In the light of the phylogenetic position of *Pp. amazonianum* isolates in clade III, this undescribed species might correspond to *Pp. vexans*, these isolates require further sequencing with additional gene markers.

Our study contributes to the knowledge about the occurrence and distribution of *Phytophthium* species, with two new records for Brazil. In addition, valuable taxonomic data is included to expand the database of *Phytophthium* species in Brazil. The number of reliable sequences in GenBank is increasing, supporting future studies of the genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to “Instituto Florestal” for the permission given to collect samples in the studied areas. We also wish to thank FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de São Paulo”) for the financial support given to SCO da Paixão (Process N° 2016/18787-5), DRS Colombo (Process N° 2018/05602-2) and CLA Pires-Zotarelli (Process N°. 2016/11146-4). CNPq (“Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”) is also acknowledged for the grant given to CLA Pires-Zotarelli (Process N° 304091/2018-9). The authors would also like to thank the valuable contribution of the anonymous reviewer.

REFERENCES

- Bala K, Robideau GP, Lévesque A, *et al.* (2010) *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Levésque, sp. nov. *Persoonia* **24**: 127–139.
- Baten MDA, Mingzhu L, Motohashi K, *et al.* (2015) Two new species, *Phytopythium iriomotense* sp. nov. and *P. aichiense* sp. nov., isolated from river water and water purification sludge in Japan. *Mycological Progress* **14**: 1–12.
- Baptista FR, Pires-Zotarelli CLA, Rocha M, *et al.* (2004) The genus *Pythium* Pringsheim from Brazilian cerrado areas, in the state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 281–290.
- Beakes GW, Thines M (2017) Hyphochytriomycota and Oomycota. In: *Handbook of the Protists* (eds. Archibald, J., Simpson, A., Slamovits, C.), Springer International Publishing, Cham: 435–505.
- Benfradj, N, Migliorini D, Lucchi N, *et al.* (2017) Occurrence of *Pythium* and *Phytopythium* species isolated from Citrus trees infected with gummosis disease in Tunisia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **50**: 286–302.
- Bennett, RM, Nam B, Dedeles GR, *et al.* (2017) *Phytopythium leanoi* sp. nov. and *Phytopythium dogmae* sp. nov., *Phytopythium* species associated with mangrove leaf litter from the Phillipines. *Acta Mycologica* **52**: 1–13.
- Bouket AC, Babai-Ahari A, Arzanlou M, *et al.* (2016) Morphological and molecular characterization of *Phytopythium litorale* and *Pp. oedochilum* from Iran. *Nova Hedwigia* **1–2**: 257–270.

- Carvalho PCT (1965). Microorganismos do solo associados as podridões dos toletes de cana-de-açúcar. *Revista Agriculturas* **40**: 83–94.
- Chen JJ, Feng H, Wang YC, *et al.* (2019a). *Phytopythium nanjingense* sp. nov. (Pythiaceae, Peronosporales) from southern China based on morphological and molecular characters. *Phytotaxa* **403**: 239–247.
- Chen, JJ, Feng H, Zheng X (2019b). Two species of *Phytopythium* (Pythiales, Pythiales) new to China. *Journal of Microbiology & Experimentation* **7**: 228–233.
- de Cock A, Lodhi AM, Rintoul TL, *et al.* (2015). *Phytopythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* **34**: 25–39.
- Derviş S, Türkölmez S, Osman Çiftçi O, *et al.* (2020). *Phytopythium litorale*: A novel killer pathogen of plane (*Platanus orientalis*) causing canker stain, root and collar rot. *Plant disease*. **104**: in press.
- Drechsler C (1930). Some new species of *Pythium*. *Journal of the Washington Academy of Sciences* **20**: 398–418.
- Drechsler C (1941). Three species of *Pythium* with proliferous sporangia. *Phytopathology* **31**: 478– 507.
- Fuentes YMO, Pérez AH, Ortiz JCD, *et al.* (2018). First report of avocado tree wilt by *Pythium* sp. *amazonianum* in Mexico. *Ciencia e Investigación Agraria* **45**: 301–305.
- Fuller MS, Jaworski A (1987). *Zoosporic Fungi in teaching and research*. Athens, Georgia.
- Gonçalves DR, Jesus AL, Pires-Zottarelli CLA (2017). *Pythium* and *Phytopythium* species associated with hydroponically grown crops around the city of São Paulo, Brazil. *Tropical Plant Pathology* **41**: 397–405.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Jesus AL, Gonçalves DR, Rocha SCO, *et al.* (2016). Morphological and phylogenetic analyses of three *Phytopythium* species (Peronosporales, Oomycota) from Brazil. *Cryptogamie Mycologie* **37**: 117–128.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* **108**: 1–7.
- Levesque AC, de Cock A (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* **108**: 1363–1383.

- Marano AV, Jesus AL, de Souza JI, *et al.* (2014). A new combination in *Phytophythium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* **5**:510–522
- Mcleod A, Botha WJ, Meitz JC, *et al.* (2009). Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* **113**: 933–951.
- Milanez AI (1989). *Fungos de águas continentais*. In: *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico* (coords Fidalgo O., Bononi V.L.) Série documentos, São Paulo, Brasil: 17–20.
- Milanez AI, Pires-Zottarelli CLA, Gomes AL (2007). *Brazilian Zoosporic Fungi*. São Paulo, Brasil: 1–113.
- Nam B, Choi YJ (2019). *Phytophythium* and *Pythium* Species (Oomycota) Isolated from Freshwater Environments of Korea. *Mycobiology* **47**: 261–272.
- Nechwatal J, Mengden K (2006). *Pythium litorale* sp. nov., a new species from the littoral of lake constance, Germany. *FEMS Microbiology Letters* **255**: 96–101.
- Pires-Zottarelli CLA (1999). Fungos zoospóricos dos Vales dos Rios Moji e Pilões, Região de Cubatão, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Posada D (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **2**: 1253–1256.
- Riethmüller A, Voglmayr H, Göker M, *et al.* (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, *et al.* (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* **11**: 1002–1011.
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A, *et al.* (2018). Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophythium vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* **57**: 89–106.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, *et al.* (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.

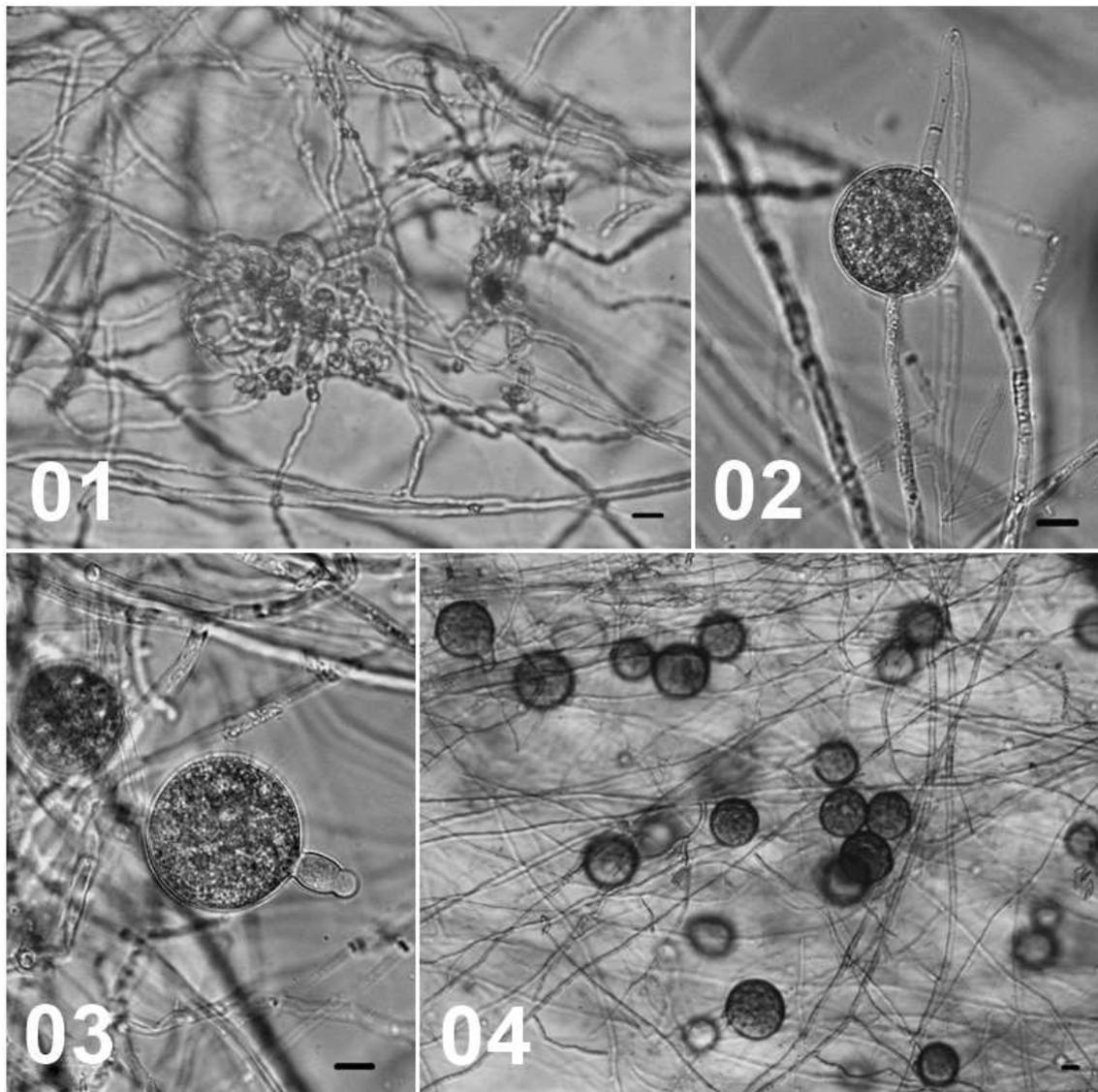
- Santoso PJ, Aryantha INP, Pancoro A, *et al.* (2015). Identification of *Pythium* and *Phytophthora* associated with Durian (*Durio* sp.) in Indonesia: Their Molecular and Morphological Characteristics and Distribution. *Asian Journal of Plant Pathology* **9**: 59–71.
- Schmitz A, Riesner D (2006). Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* **354**: 311–313.
- Sideris CP (1932). Taxonomic studies in the family Pythiaceae. II. *Pythium*. *Mycologia* **24**: 14–61.
- Spies CFJ, Mazzola M, Botha WJ, *et al.* (2011). Oogonial biometry and phylogenetic analyses of the *Pythium vexans* species group from woody agricultural hosts in South Africa reveal distinct groups within this taxon. *Fungal Biology* **115**: 157–168.
- Stamatakis A (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312–1313.
- Tkaczyk M (2020). *Phytopythium*: origin, differences and meaning in modern plant pathology. *Folia Forestalia Polonica* **62**: 227–232.
- Thao LD, Hien LT, Liem NV, *et al.* (2020). First report of *Phytopythium vexans* causing root rot disease on durian in Vietnam. *New Disease Reports* **41**: 2.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R (2010). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* **27**: 171–180.
- van der Plaats-Niterink AJ (1981). Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* **1**: 1–242.
- Wijayawardene NN, Hyde KD, Al-Ani LKT, *et al.* (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* **11**: 1060–1456.

Tab. 1. GenBank accession number of the sequences considered in our data set. (NA)

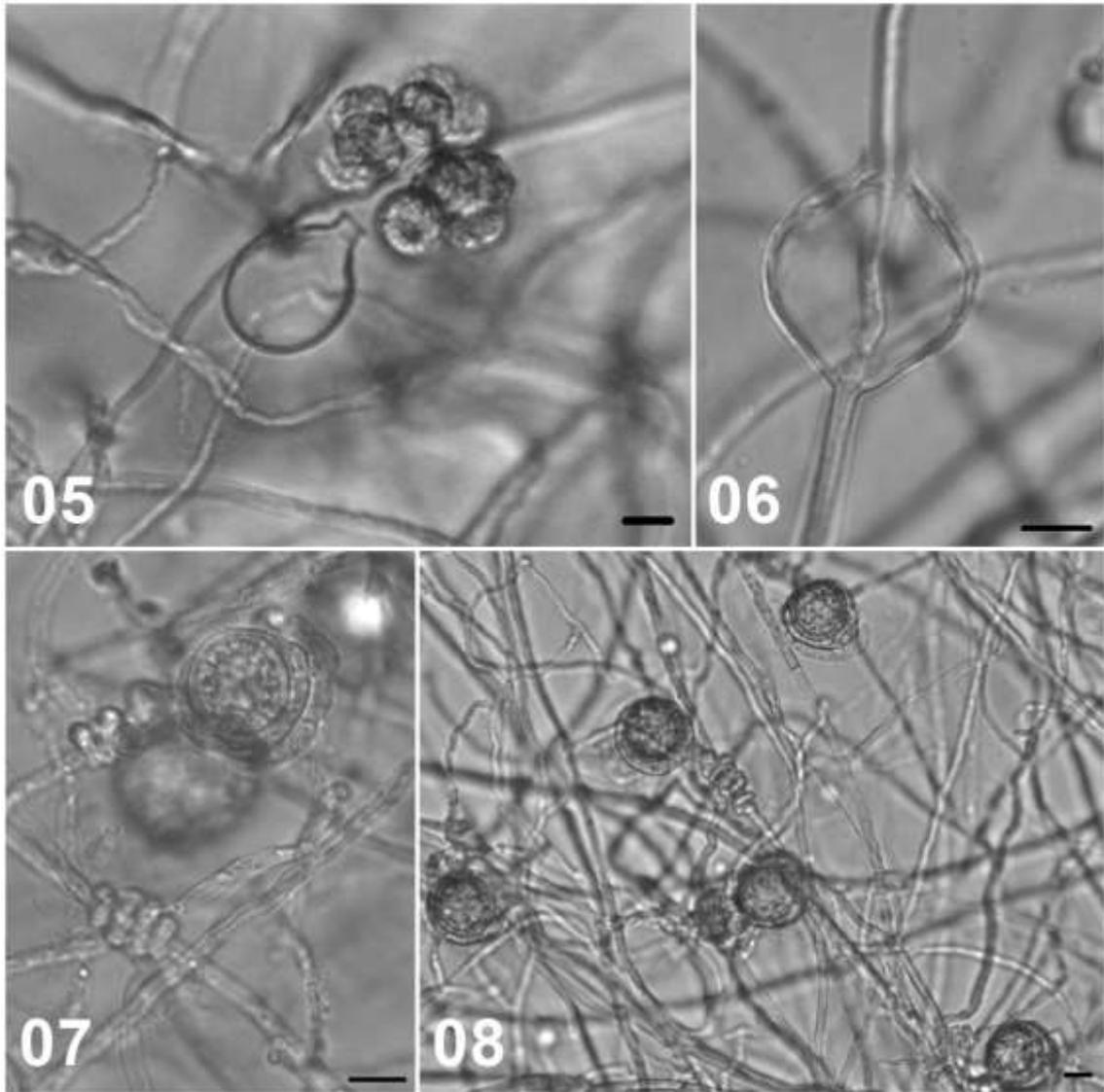
Data unknown

Specimens	Strain no.	GenBank Accession Number	
		ITS/LSU	
<i>Pythium takayamanum</i>	CBS122.492	HQ643853	HQ665094
<i>P. takayamanum</i>	CCIBt4040	KM058758	KM058755
<i>Phytopythium amazonianum</i>	WPC8243B519	GU258937	NA
<i>Pp. amazonianum</i>	WPC8239B1845	GU258624	NA
<i>Pp. boreale</i>	CBS551.88	AB725879	HQ665261
<i>Pp. carbonicum</i>	CBS292.37	AB690620	NA
<i>Pp. carbonicum</i>	CBS112.544	AB725876	AB996605
<i>Pp. chamaehyphon</i>	CPZ68	MT620967	MT612335
<i>Pp. chamaehyphon</i>	CCIBt4338	MT620968	MT612336
<i>Pp. chamaehyphon</i>	CCIBt4407	MT620969	MT612337
<i>Pp. chamaehyphon</i>	CBS259.30	AB690609	HQ665177
<i>Pp. chamaehyphon</i>	PPRI8625	FJ415975	NA
<i>Pp. citrinum</i>	S-12	AY197328	AB948195
<i>Pp. curcubitacearum</i>	CBS748.96	AB725877	AB690598
<i>Pp. delawarensis</i>	382B	AB725875	AB690591
<i>Pp. dogmae</i>	USTCMS4101	MF353170	MF373431
<i>Pp. fagopyri</i>	HonMa	AB690615	AB690588
<i>Pp. fagopyri</i>	FP1	AB690621	AB690599
<i>Pp. fagopyri</i>	CBS293.35	AB690617	AB690590
<i>Pp. helicoides</i>	CBS286.31	AB725878	MF375637
<i>Pp. helicoides</i>	CCIBt4103	KR092138	NA
<i>Pp. helicoides</i>	CCIBt4104	KR092137	NA
<i>Pp. indigoferae</i>	CBS261.30	AY598714	NA
<i>Pp. indigoferae</i>	KS38	KJ002704	NA
<i>Pp. iriomotense</i>	GUCC0025	AB690622	AB690600
<i>Pp. iriomotense</i>	GUCC7020	AB690629	AB690607
<i>Pp. kandeliae</i>	CBS111.91	HQ643134	HQ665065
<i>Pp. kandeliae</i>	ALJ26	KJ399962	KJ399965
<i>Pp. leanoi</i>	USTCMS4102	MF353169	MF373430
<i>Pp. leanoi</i>	CBS113.91	MF355474	KJ399963
<i>Pp. litorale</i>	GUCC7167	AB690612	AB690583
<i>Pp. litorale</i>	CCIBt4659	MT620970	MT612338
<i>Pp. litorale</i>	CCIBt4663	MT620971	MT612339
<i>Pp. litorale</i>	SCP82	MT620972	MT612340
<i>Pp. megacarpum</i>	CBS112.351	AB725881	HQ665067
<i>Pp. mercurial</i>	CBS112.443	AB725882	KF853236
<i>Pp. mirpurensis</i>	<u>CBS124.524</u>	KJ831614	NA
<i>Pp. montanum</i>	CBS111.349	AB725883	HQ665064
<i>Pp. montanum</i>	ADC9762	HQ643391	NA
<i>Pp. nangingjense</i>	Chen216	MF459636	NA
<i>Pp. nangingjense</i>	Chen218	MF459635	NA
<i>Pp. oedochilum</i>	CBS292.37	AB690619	HQ665191
<i>Pp. oedochilum</i>	CBS738.94	HQ643394	NA
<i>Pp. ostracodes</i>	CBS768.73	AB108022	HQ665295
<i>Pp. palingenes</i>	CCIBt3981	KR092139	KR092143
<i>Pp. palingenes</i>	CCIBt4428	MT620973	MT612341
<i>Pp. palingenes</i>	CCIBt4397	MT620974	MT612342
<i>Pp. sindhum</i>	CBS124.518	HM244825	NA
<i>Pp. sindhum</i>	JKI	KJ755089	NA

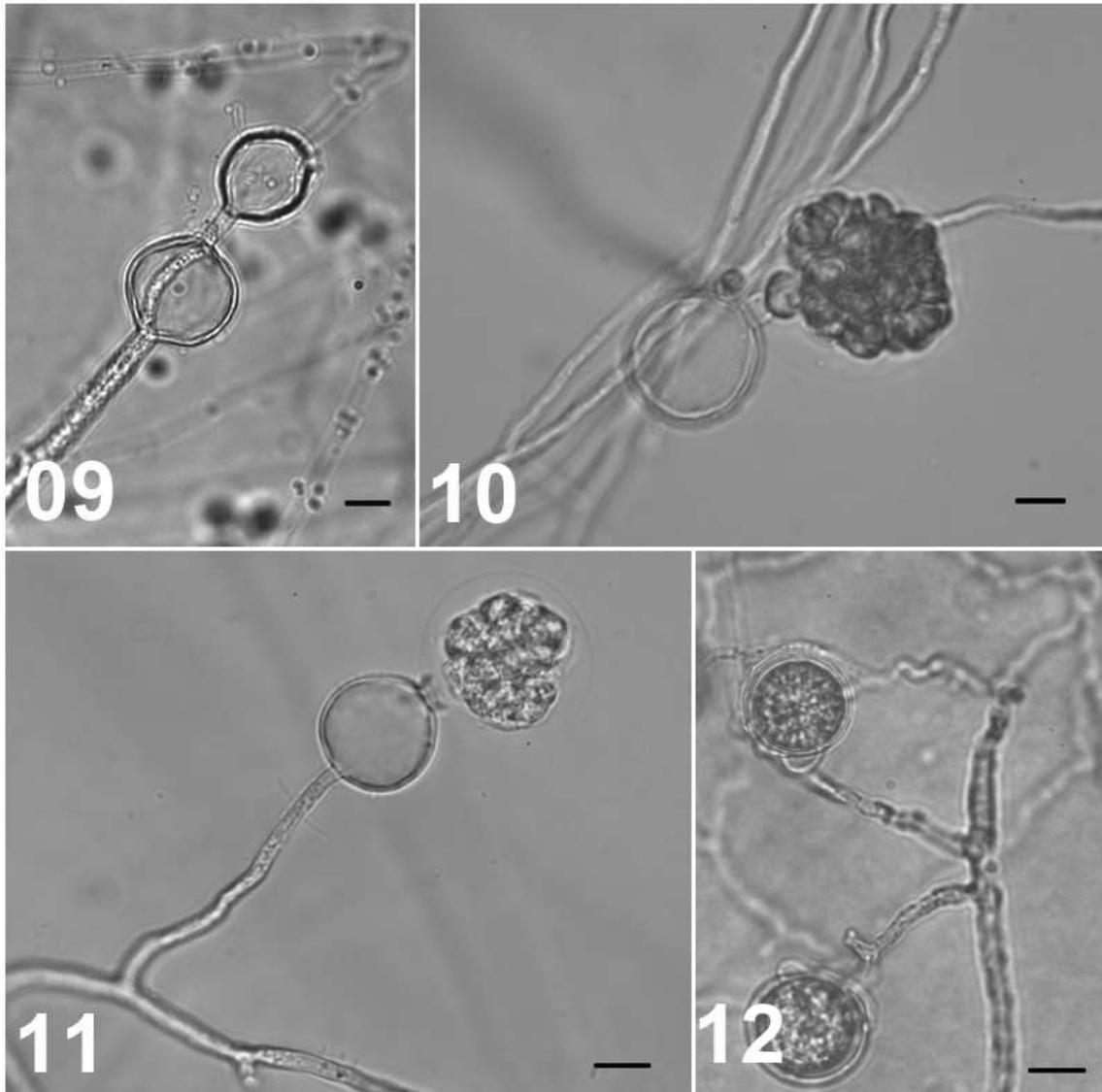
<i>Pp. vexans</i>	CCIBt4398	MT620975	MT612343
<i>Pp. vexans</i>	CCIBt4383	MT620976	MT612344
<i>Pp. vexans</i>	CCIBt4101	KR092141	KR092144



Figs 1–4. *Phytophthium chamaehyphon*. 1. Appressoria. 2. Intercalary sporangia. 3. Sporangium with discharge tube. 4. General aspect of the mycelium and sporangia. Bars 10 μ m



Figs 5–8. *Phytophthium palingenens*. **5.** Sporangium with discharged zoospores. **6.** Spherical sporangia with internal proliferation. **7.** Oogonium with antheridium applied lengthwise to the oogonium over its entire length, wrapping around the oogonial stalk and hyphae. **8.** General aspect of the mycelium with oogonia and antheridia. Bars 10 µm



Figs 9–12. *Phytophthium litorale* and *Pp. vexans*. **9–10.** *Pp. litorale*. **9.** Internal proliferation of the sporangia. **10.** Sporangium with discharged zoospores. **11–12.** *Pp. vexans*. **11.** Sporangium with discharged zoospores. **12.** Oogonia and antheridia. Bars 10 µm

