

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/08/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE *Pythium insidiosum* ÀS MARGENS DO RIO TIETÊ
NA REGIÃO DE BOTUCATU/SP E POSSÍVEIS FATORES AMBIENTAIS
ASSOCIADOS**

GABRIEL GASPARINI CAMARGO

Orientador: JOÃO PESSOA ARAÚJO JÚNIOR

Coorientadora: GISELLE SOUZA DA PAZ

**BOTUCATU – SP
2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação da incidência de *Pythium insidiosum* às margens do rio Tietê na região de Botucatu/SP e possíveis fatores ambientais associados

GABRIEL GASPARINI CAMARGO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de micro-organismos e imunidade.

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Coorientadora: Giselle Souza Da Paz

**BOTUCATU – SP
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Camargo, Gabriel Gasparini.

Avaliação da incidência de *Pythium insidiosum* às margens do rio Tietê na região de Botucatu/SP e possíveis fatores ambientais associados / Gabriel Gasparini Camargo. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Coorientador: Giselle Souza da Paz

Capes: 21201030

1. Pitiose. 2. *Pythium*. 3. Oomicetos. 4. Estudos de coortes.

Palavras-chave: Detecção molecular; Isolamento ambiental; Pitiose; *Pythium insidiosum*.

AGRADECIMENTOS

A todas pessoas que contribuíram direta e indiretamente para o fechamento de mais um ciclo de minha formação profissional e pessoal, sou grato. Sem pessoas queridas e de bem que tangenciaram minha vivência durante essa breve e conturbada jornada, eu não teria as forças necessárias. O isolamento social, imposto pela pandemia e que vivenciei de forma literal por um tempo significativo, somado às incertezas e desafios provenientes da escassez de financiamento na Pós-Graduação brasileira, fizeram desse curso uma enorme prova de resistência e resiliência.

Em especial, agradeço ao meus pais e mães de sangue e coração, Cláudia, Miguel, César e Célia. A esses agradeço os calorosos acolhimentos, confiança e incentivos, essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos e irmãs, Felipe, Guilherme, Lucas, César, Letícia e Laura, agradeço pela paciência, presença e, por entre idas e vindas, serem sempre um porto seguro.

À minha tia Simoni, que contribuiu com considerações e apontamentos valiosos, estimulando o pensamento crítico, orientando e conduzindo reflexões acerca deste trabalho e minhas trajetórias acadêmica e pessoal. Também às minhas tias Ana e Lourdes, que sempre me acolheram e rogaram as melhores energias através de suas orações.

A todos meus amigos pela presença, sempre leal e intensa. Foram primordiais em diferentes momentos dessa minha caminhada.

Aos meus professores da Educação Básica. Sobretudo os professores Alexandre, e Juvenal (*in memoriam*), que além de mestres foram grandes mentores e motivadores.

Meus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e aporte financeiro (Processo 2021/14378-1), que muito contribuiu para execução do projeto. Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela da bolsa de estudos, concedida no início do curso de Mestrado (Processo 88887.663625/2022). Suportes esses essenciais para realização deste trabalho.

Aos professores Dr. João Pessoa A. Jr., Dr. Eduardo Bagagli e Dra. Sandra M. G. Bosco, agradeço por compartilharem seus conhecimentos, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e amparo ao longo do curso. À Ma. Bruna Lindolfo, Larissa Baldo e toda a equipe do Instituto de Biotecnologia (IBTEC-UNESP/Botucatu) pela disposição em colaborar com o trabalho.

“O tempo é um rio (...), mas é preciso fazer distinções. Há rios de corredeiras, pedras e cachoeiras onde mora o perigo. E há rios mansos, rasos e preguiçosos... Rio vagaroso, tempo vagaroso.”

(ALVES, 2014, p.108)

Resumo

Os oomicetos são microrganismos do Reino Stramenipila, filogeneticamente próximos das algas e diatomáceas, e que apresentam características semelhantes aos fungos, como nutrição heterotrófica, crescimento vegetativo em forma de hifas e papéis ecológicos. Representante dos oomicetos, *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose, uma doença capaz de acometer várias espécies de animais, tendo sido relatada em diferentes países, com maior número de casos em estações chuvosas. Os zoósporos, forma infectante dos oomicetos, são liberados em meio aquático e possuem motilidade que permite a busca por substratos vegetais ou queratinosos, por possuir quimiotaxia positiva para ambos. Apesar do conhecimento sobre o ciclo de vida de *P. insidiosum*, fatores ambientais limitantes e facilitadores para estabelecimento do patógeno no ambiente são pouco compreendidos. A detecção e isolamento de *P. insidiosum* do ambiente por métodos convencionais, como de iscagem e uso de meios de cultura seletivos, são pouco efetivos devido sua baixa sensibilidade, enquanto que técnicas moleculares são mais eficientes na detecção do patógeno no ambiente. O objetivo do projeto é identificar e monitorar a incidência de *P. insidiosum* às margens do rio Tietê na região de Botucatu/SP e caracterizar os ambientes quanto a incidência do patógeno por meio do levantamento de fatores ambientais possivelmente associados ao seu estabelecimento no ambiente. Para tanto, coletas de água foram realizadas em coluna d'água de ± 10 cm de profundidade, em duplicata, e acondicionadas em frascos âmbar. Para realização do isolamento convencional, foi feita coleta de água em frascos contendo fragmento de ecdise de serpente, previamente esterilizados, e o conjunto armazenado em 35°C por 24h. Após a incubação, a isca foi transferida para meio de cultura seletivo para *P. insidiosum* e observada por até 10 dias. Para filtração, foi coletada água nos mesmos locais, em duplicata, a qual foi armazenada em gelo para transporte e posterior filtração. O processo de filtração para obtenção de *environmental*-DNA (eDNA), foi feito com auxílio de bomba a vácuo, em filtro NCE (*nitrate cellulose*) com poros de 0,45 μ m. O conteúdo do filtrado foi extraído utilizando protocolo *in house* CTAB adaptado. A detecção do patógeno nas amostras extraídas foi feita por PCR convencional (cPCR), *nested* PCR utilizando primers específicos para *P. insidiosum* (*Pi1* e *Pi2*) e os amplicons revelados por eletroforese em gel de agarose. Também foi aplicada técnica de PCR em tempo real (qPCR) utilizando os mesmos primers. A temperatura e pH da água foram aferidos *in loco*. O índice de precipitação pluviométrica, com intervalo de 15 dias anteriores à data de coleta, foi obtido em base de dados de estações meteorológicas, administradas por órgãos como INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) e CIIAGRO (Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas).

Do total de 20 pontos amostrados, foi detectada presença de material genético do patógeno em 5 (25%), por meio de técnica molecular, enquanto que por método convencional foi registrado um isolamento (2,5%). Amostras positivas foram obtidas em água com diferentes temperaturas, com amplitude térmica de 11°C. Entre os locais amostrados, o pH apresentou variação entre 5,3 e 6,8, sendo a maioria caracterizado como levemente ácido. Em todos pontos em que foi detectada presença de material genética do patógeno houve registro de pluviosidade e presença de vegetação imediatamente próximas aos pontos de coleta, sobretudo representantes da família Poaceae (gramíneas).

Os resultados indicam uma tendência na detecção e presença de *P. insidiosum* mesmo em água com temperatura amena. Ambientes com altas temperaturas são tidos como condição favorável para desenvolvimento do microrganismo e alta produção de zoósporos, no entanto houve um isolamento de *P. insidiosum* em temperatura amena (21°C), sugerindo versatilidade quanto sua dispersão no ambiente. Métodos moleculares podem ser uma alternativa de alta eficácia para detecção do patógeno em áreas de risco.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*, isolamento ambiental, pitiose, detecção molecular

Abstract

Oomycetes are microorganisms from the Stramenopila Kingdom, phylogenetically close to algae and diatoms, presenting characteristics similar to fungi, such as heterotrophic nutrition, vegetative growth in the form of hyphae, and ecological roles. *Pythium insidiosum*, a representative of oomycetes, is the etiological agent of pythiosis, a disease capable of affecting various animal species, reported in different countries, with a higher number of cases during rainy seasons. Zoospores, the infective form of oomycetes, are released in aquatic environments and possess mobility that allows them to search for plant or keratin substrates, possessing positive chemotaxis for both. Despite knowledge about the life cycle of *P. insidiosum*, limiting and facilitating environmental factors for the pathogen's establishment are poorly understood. The detection and isolation of *P. insidiosum* from the environment through conventional methods, such as baiting and the use of selective culture media, are not very effective due to their low sensitivity, whereas molecular techniques are more efficient in detecting the pathogen in the environment.

The project's objective is to identify and monitor the incidence of *P. insidiosum* along the banks of the Tietê River in the Botucatu/SP region and characterize the environments in terms of the pathogen's incidence by surveying environmental factors possibly associated with its establishment in the environment. To this end, water samples were collected from a ± 10 cm water column depth in duplicates and stored in amber bottles. For conventional isolation, water samples were collected in bottles containing snake ecdysis fragments that were previously sterilized, and the set was stored at 35°C for 24 hours. After incubation, the bait was transferred to a selective culture medium for *P. insidiosum* and observed for up to 10 days. For filtration, water was collected from the same locations in duplicates, stored on ice for transport, and subsequently filtered. The filtration process to obtain environmental DNA (eDNA) was carried out using a vacuum pump on a 0.45 μ m nitrate cellulose filter (NCE). The filtrate content was extracted using an adapted in-house CTAB protocol. The detection of the pathogen in the extracted samples was performed using conventional PCR (cPCR) and nested PCR with specific primers for *P. insidiosum* (Pi1 and Pi2), and the amplicons were revealed by agarose gel electrophoresis. Real-time PCR (qPCR) was also applied using the same primers. Water temperature and pH were measured on-site. The precipitation index, with a 15-day interval prior to the collection date, was obtained from meteorological station databases administered by organizations such as INMET (National Institute of Meteorology) and CIIAGRO (Integrated Center of Agrometeorological Information).

Out of the total of 20 sampled points, genetic material of the pathogen was detected in 5 points (25%) through molecular techniques, while conventional methods yielded one isolation (2.5%). Positive samples were obtained from water with different temperatures, with a thermal range of 11°C. Among the sampled locations, the pH varied between 5.3 and 6.8, with the majority being slightly acidic. In all points where the pathogen's genetic material was detected, there was recorded rainfall and the presence of vegetation immediately near the collection points, especially representatives of the Poaceae family (grasses).

The results indicate a trend in detecting the presence of *P. insidiosum* even in water with moderate temperatures. Environments with high temperatures are considered favorable conditions for the organism's development and high zoospore production. However, there was an isolation of *P. insidiosum* at a moderate temperature (21°C), suggesting versatility in its environmental dispersal. Molecular methods could be a highly effective alternative for detecting the pathogen in high-risk areas.

Keywords: *Pythium insidiosum*, environmental isolation, pythiosis, molecular detection.

Lista de figuras

- Figura 1: Ciclo de vida do *Pythium insidiosum* no ambiente. Adaptado de Paz *et al.* (2022). 18
- Figura 2: Representação da heterogeneidade dos ambientes amostrados, quanto a vegetação e turbidez da água. (A e B) representam ponto de coleta 6A, (C e D) ponto 10A e (E e F) o ponto de coleta 3B.38
- Figura 3: Eletroforese da reação de cPCR das amostras de eDNA extraídas, tendo como alvo *primers* da região 16S universais para bactérias, com *amplicons* de 1500pb.41
- Figura 4: Resultado da reação para geração da curva de eficiência da técnica de qPCR utilizando amostra controle de *Pythium insidiosum* e *primers* Pi-1 e Pi-2. (A) Curva de amplificação da reação até diluição de 10^{-6} , em ordem decrescente. (B) Gráfico da curva de eficiência da reação, com 6 pontos. (C) Gráfico da curva de dissociação obtida na reação.42
- Figura 5: Colônias isoladas sob suspeitas de *Pythium* sp. (A e B) *Pythium longipapillum*, provenientes dos pontos 1A e 1B, respectivamente. (C) sem identificação, proveniente do ponto 2A. (D) *Pythium* sp., isolado no ponto 9B. (E) *Pythium insidiosum*, ponto 2A.44
- Figura 6: *Amplicons* revelados por eletroforese em gel de agarose, provenientes da reação de cPCR com *primers* Pi-1 e Pi-2 (~105 pb). (C1 a C14) Amostras de gDNA proveniente de culturas isoladas por método convencional. (PC) controle positivo; (NC) controle negativo. 46
- Figura 7: *Amplicons* revelados por eletroforese em gel de agarose, provenientes da reação de nPCR. (A) *Amplicons* obtidos na primeira reação, com *primers* ITS 4 e 5. (B) *Amplicons* da segunda reação, com *primers* Pi-1 e Pi-2. (C1 a C14) Amostras de gDNA proveniente de culturas isoladas por método convencional. (PC) controle positivo; (NC) controle negativo .47
- Figura 8 : Curva de amplificação de qPCR aplicada às amostras de eDNA.49
- Figura 9: Mapa indicando pontos amostrados que foram positivos e negativos para detecção de *Pythium insidiosum*.51
- Figura 10: Dados das variáveis ambientais avaliadas, destacando valores de média de cada grupo para variáveis Temperatura da água e pH, e mediana para Pluviosidade.52

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados referentes às datas, cidade e localização geográfica dos pontos amostrados neste trabalho.	30
Tabela 2: Dados das estações meteorológicas consultadas para levantamento de pluviosidade. Fonte: https://mapas.inmet.gov.br/	32
Tabela 3: Dados ambientais mensurados em cada um dos pontos amostrados.....	39
Tabela 4: Identificação molecular utilizando <i>primers</i> ITS 4 e 5 de culturas puras e colônias suspeitas de <i>Pythium</i> sp.	45
Tabela 5: Análise molecular de isolados, tendo <i>primers</i> Pi-1 e Pi-2 como alvos.	48
Tabela 6: Resultados obtidos em cada uma das técnicas de PCR convencional (cPCR), <i>nested</i> PCR (nPCR) e PCR em Tempo Real (qPCR), aplicadas às amostras de eDNA.....	50

Lista de Abreviações

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide

CIIAGRO - Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas

cPCR – Conventional Polymerase Chain Reaction

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

eDNA – Environmental DNA

Genbank - Banco de dados públicos de sequencias nucleotídicas e proteínas no National Center for Biotechnology

Hostpost – área de grande biodiversidade

in silico – Aplicação de ferramenta computacional para análises

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

ITS – *Internal transcribed spacer*

MCE – *mixed cellulose ester*

MIPi – Meio de cultura para Isolamento de *Pythium insidiosum*

NC – *Cellulose nitrate*

NCBI - *National Center for Biotechnology*

nPCR – *nested Polymerase chains Reaction*

PCR – *Polymerase Chains Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico

Pi – *Pythium insidiosum*

Primers – Iniciadores com sequência de nucleotídeos específicos

qPCR – *quantitative Polymerase Chain Reaction*

sp. – Uma espécie do gênero

spp. – Mais de uma espécie do gênero

UV – Ultravioleta

Sumário

Introdução e Revisão Bibliográfica.....	12
Oomicetos	14
Pitiose: uma doença emergente	15
Agente etiológico da pitiose.....	17
Detecção de <i>Pythium insidiosum</i> no ambiente.....	19
Técnicas moleculares de identificação e monitoramento ambiental	23
Objetivo	29
Objetivos específicos.....	30
Materiais e Métodos	30
Área de Estudo	30
Análise de fatores ambientais.....	31
Isolamento convencional	32
Identificação morfológica e molecular dos isolados	33
Técnicas cPCR, nPCR e qPCR	35
Sequenciamento das amostras	36
Análises estatísticas.....	37
Resultados	37
Caracterização ambiental.....	37
Controle da extração de eDNA.....	40
Teste dos <i>primers</i> Pi-1 e Pi-2 e eficiência da reação de qPCR.....	41
Isolamento convencional: identificação morfológica e molecular	42
Detecção Molecular de <i>P. insidiosum</i> a Partir de eDNA	48
Análises estatísticas.....	51
Discussão	52
Conclusão	56
Referências	58
APÊNDICE	67
1. Quantificação das amostras de eDNA.....	67
2. Eletroforese da reação de cPCR de amostras de eDNA, com <i>primers</i> Pi-1 e Pi-2.....	68
3. Eletroforese das reações de nPCR de amostras de eDNA. (A) <i>primers</i> ITS 4 e 5; (B) <i>primers</i> Pi-2 e Pi-2.....	69

Introdução e Revisão Bibliográfica

Os oomicetos são organismos complexos, que apresentam semelhanças com os fungos, como o crescimento vegetativo em forma de hifas e o sistema de nutrição heterotrófico, além de desempenhar papéis ecológicos similares, podendo se apresentar como parasita, saprotrófico, biotrófico ou necrotrófico (JUDELSON, 2017) (AH-FONG *et al.*, 2019). Apesar das semelhanças na forma de vida, filogeneticamente, os oomicetos estão mais relacionados às algas pardas e diatomáceas, e apresentam uma distribuição cosmopolita, em habitats como solo e ambiente aquático (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) (GAASTRA, 2010) (BEAKES; THINES, 2017). Evidências morfológicas da proximidade evolutiva entre oomicetos e algas são a composição da parede celular, que difere estruturalmente dos chamados fungos verdadeiros, bem como sua membrana plasmática que se diferencia devido à ausência da molécula ergosterol, principal esteroide encontrado nos fungos ditos verdadeiros (Eumycota) (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) (BEAKES; THINES, 2017) (SPRING *et al.*, 2018) (GAASTRA, 2010) (PERMPALUNG *et al.*, 2019).

Muitas espécies de oomicetos se apresentam como parasitas de plantas e/ou animais, inclusive mamíferos. A infecção de mamíferos por oomiceto acomete o hospedeiro com uma doença chamada pitiose, a qual tem como agente etiológico a espécie *Pythium insidiosum* e atinge diferentes animais, como equinos, bovinos, caprinos, cães, gatos e humanos (PESAVENTO *et al.*, 2008) (KEOPRASOM *et al.*, 2013) (PEREIRA *et al.*, 2010) (ZARO *et al.*, 2018) (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019) (DO CARMO; UZAL; RIET-CORREA, 2021).

A pitiose é relatada em diferentes partes do mundo, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais do planeta. O ciclo de vida do patógeno foi proposto por MILLER (1983), no entanto, ainda é preciso compreender melhor seu nicho ecológico (MAR HTUN *et al.*, 2021). Relatos de casos e estudos de detecção/isolamento ambiental de *P. insidiosum*, tem apontado que fatores como umidade, pluviosidade, temperatura e presença de vegetação influenciam para seu estabelecimento no ambiente (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) (LEAL *et al.*, 2001) (SANTURIO *et al.*, 2006) (SUPABANDHU *et al.*, 2008) (SANTOS *et al.*, 2013) (MACHADO; WEIBLEN; ESCOBAR, 2018). Tais condições sustentam requisitos necessários para seu desenvolvimento e ciclos de vida, uma vez que estes consistem na colonização de substratos vegetais, como plantas aquáticas, e produção de zoósporos biflagelados que posteriormente são liberados na água (SANTURIO *et al.*, 2006) (SUPABANDHU *et al.*, 2008) (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). A produção de zoósporos faz parte da fase

assexuada do ciclo de vida, em que há sua dispersão no ambiente e a atração quimiotóxica por movimento natatório, conferido pelos flagelos, em direção a substratos vegetais ou de queratina para encistamento do organismo (GAASTRA *et al.*, 2010). A região de Botucatu/SP registra ocorrências de casos de pitiose acometendo principalmente equinos e um caso de pitiose humana, sendo o primeiro registro da América Latina (BOSCO *et al.*, 2005) (WATANABE *et al.*, 2015) (PAZ *et al.*, 2022).

São escassos os estudos de isolamento ambiental para compreensão da distribuição de *P. insidiosum* no ambiente. O isolamento ambiental do patógeno por método convencional de iscagem é caracterizado como dispendioso, devido aos diversos fatores associados ao sucesso na obtenção de cultura pura (MILLER, 1983) (ZAMBRANO *et al.*, 2017) (MAR HTUN *et al.*, 2021). A possibilidade de distribuição restrita a pequenas áreas do nicho aquático e a dificuldade de isolamento seguindo método convencional também são relatadas por SUPABANDHU e colaboradores (2008), os quais atribuem insucessos de isolamento à baixa sensibilidade do método de iscagem.

Atualmente, sob ameaças de diminuição da biodiversidade devido efeitos de ações antrópicas, observa-se crescimento de técnicas associadas ao monitoramento biológico.

Devido dificuldades de aplicação, viabilidade e baixa eficiência de métodos tradicionais de monitoramento da biodiversidade, novas técnicas, como coleta de DNA ambiental (eDNA – *environmental DNA*) associadas a técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), têm sido adotadas por serem menos invasivas e fornecerem resultados satisfatórios para identificação e detecção de organismos no ambiente (TABERLET *et al.*, 2012) (THOMSEM; WILLERSLEV, 2015). Devido ao fato de *P. insidiosum* ser um organismo de difícil isolamento, técnicas de biologia molecular podem auxiliar na detecção e monitoramento do patógeno nas áreas amostradas. Através da extração de eDNA e aplicação da técnica de *nested* PCR, pode-se detectar a presença recente do organismo no ambiente sem que se dependa somente de métodos convencionais ou pouco eficazes, como o método de iscagem (REES *et al.*, 2014).

Pela rápida degradação da molécula de DNA em ambientes aquáticos, a identificação de um organismo utilizando técnicas de obtenção de eDNA pode indicar a presença do organismo naquele ambiente no momento de coleta ou remontar sua presença em um passado recente (THOMSEM; WILLERSLEV, 2015). Por isso, a compreensão do nicho ecológico do patógeno, por meio da caracterização do ambiente de coleta e do mapeamento da incidência do patógeno na região por técnicas moleculares, podem fornecer informações para entender sua distribuição ao longo do curso do rio e estabelecer *hotspots* da doença para futuros estudos

Conclusão

Esse trabalho evidencia a detecção molecular a partir de amostras de eDNA como melhor alternativa para o monitoramento de *P. insidiosum* no ambiente, quando comparada com a técnica de isolamento do patógeno por iscagem. Dentre os locais amostrados, Botucatu/SP e São Manuel/SP se apresentam como regiões endêmicas para presença do patógeno na região, que mesmo em períodos do ano com temperaturas amenas, podem representar riscos de infecção e acometimento da pitiose. Com base nas observações de campo e resultados obtidos no presente trabalho, consideramos a possibilidade de que plantas gramíneas (Poaceae)

estejam mais intimamente relacionadas com o estabelecimento do patógeno no ambiente. Nesse estudo não foi possível estabelecer correlação entre pluviosidade e detecção de *P. insidiosum*. Quanto ao pH, a faixa de valores encontrados nos corpos d'água amostrados não demonstra exercer efeito como fator limitante para o desenvolvimento do patógeno.

A técnica de extração de eDNA utilizada nesse estudo se mostrou eficiente, no entanto os resultados obtidos nas reações de PCR evidenciam a necessidade de pré-tratamento do produto da extração, de forma a eliminar possíveis inibidores da reação.

Por último, por ser uma região endêmica, os locais amostrados ao longo do rio Tietê e seus afluentes se mostram importantes para futuros estudos referentes à distribuição do oomiceto na região e o nicho ecológico que ocupa.

Referências

- AH-FONG, A. M. V. *et al.* Niche-specific metabolic adaptation in biotrophic and necrotrophic oomycetes is manifested in differential use of nutrients, variation in gene content, and enzyme evolution. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007729, 19 abr. 2019.
- ALAHUHTA, J. *et al.* Macroecology of macrophytes in the freshwater realm: Patterns, mechanisms and implications. **Aquatic Botany**, v. 168, p. 103325, jan. 2021.
- ALVES, Rubem. **O sapo que queria ser príncipe: adolescência e juventude**. São Paulo: Planeta, 2014.
- ANDREW OGRAM; GARY S SAYLER; TAMAR BARKAY. OGRAM 1987_ The extraction and purification of microbial DNA from sediments.pdf. **The extraction and purification of microbial DNA from sediments**, v. 7, p. 57–66, 1987.
- ANGELOCCI, L. R.; NOVA, N. A. V. Variações da temperatura da água de um pequeno lago artificial ao longo de um ano em Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 3, p. 431–438, dez. 1995.
- BARBOSA, J. D. *et al.* Cutaneous pythiosis in equines in the Amazon Biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 43, p. 1-7, 2023.
- BARENDREGT, A.; BIO, A. M. F. Relevant variables to predict macrophyte communities in running waters. **Ecological Modelling**, v. 160, n. 3, p. 205–217, fev. 2003.
- BARNES, M. A. *et al.* Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 3, p. 1819–1827, 4 fev. 2014.
- BEAKES, G. W.; GLOCKLING, S. L.; SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 3–19, jan. 2012.
- BENHAMOU, N. *et al.* Pythium oligandrum: an example of opportunistic success. **Microbiology**, v. 158, n. 11, p. 2679–2694, 1 nov. 2012.
- BERNARDO, Fábio D. *et al.* Pythiosis in sheep from Paraná, southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 513-517, jun. 2015
- BOSCO, S. DE M. G. *et al.* Human Pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715–718, maio 2005.
- BRUNO, D. W.; WEST, P. VAN; BEAKES, G. W. *Saprolegnia* and other oomycetes. Em: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. (Eds.). **Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections**. 2. ed. UK: CABI, 2011. p. 669–720.
- CALVANO, T. P. *et al.* Pythium aphanidermatum Infection following Combat Trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3710–3713, out. 2011.
- CARRERA, M. V. *et al.* Pitiose em ovinos nos estados de Pernambuco e Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 476–482, abr. 2013.

- CARVALHO, F. T. *et al.* Plantas aquáticas e nível de infestação das espécies presentes no reservatório de Barra Bonita, no rio Tietê. **Planta Daninha**, v. 21, p. 15–19, 2003
- CASALE DALLA VILLA, M. E.; SAMPAIO, T. V. M. VARIABILIDADE ESPACIAL E TEMPORAL DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICO EM AMBIENTE LÊNTICO. **Boletim de Geografia**, v. 34, n. 2, p. 69, 23 dez. 2016.
- CHAIPRASERT, A. *et al.* Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 317–323, jun. 1990.
- CHAMBERS, P. A. *et al.* Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 9–26, jan. 2008.
- COBLE, A. A. *et al.* eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. **Science of The Total Environment**, v. 649, p. 1157–1170, fev. 2019.
- CZECZUGA, B. *et al.* Effect of Aquatic Plants on the Abundance of Aquatic Zoosporic Fungus Species. p. 10, 2004.
- DAVIS, D. J. *et al.* Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**, v. 110, n. 1, p. 96–103, jan. 2006.
- DE COCK, A. W. *et al.* *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344–349, fev. 1987.
- DE MORAES GIMENES BOSCO, S. *et al.* Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 557–565, jan. 2008.
- DEINER, K. *et al.* Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. **Biological Conservation**, v. 183, p. 53–63, mar. 2015.
- DEJEAN, T. *et al.* Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–4, 8 ago. 2011.
- DEREVNINA, L. *et al.* Nine things to know about elicitors. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 888–895, dez. 2016.
- DO CARMO, P. M. S.; UZAL, F. A.; RIET-CORREA, F. Diseases caused by *Pythium insidiosum* in sheep and goats: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 1, p. 20–24, jan. 2021.
- DOS SANTOS, C. E. P. *et al.* Epidemiological Survey of Equine Pythiosis in the Brazilian Pantanal and Nearby Areas: Results of 76 Cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 2, p. 270–274, fev. 2014.
- DYKSTRA, M. J. *et al.* A description of cutaneous–subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, p. 7, 1999.

EDWARDS, G. A.; AMIRTHARAJAH, A. Removing Color Caused by Humic Acids. **Journal - American Water Works Association**, v. 77, n. 3, p. 50–57, mar. 1985.

EICHMILLER, J. J.; BEST, S. E.; SORENSEN, P. W. Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 4, p. 1859–1867, 16 fev. 2016.

EICHMILLER, J. J.; MILLER, L. M.; SORENSEN, P. W. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 1, p. 56–68, jan. 2016.

ELLISON, S. L. *et al.* Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. **BMC Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 33, dez. 2006.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998

FERNANDES, L. F. *et al.* Comunidades Fitoplanctônicas em Ambientes Lênticos. In: ANDREOLI, C. V., CARNEIRO, C. (Eds.). **Gestão de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR. 2005

FICETOLA, G. F. *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4, n. 4, p. 423–425, 23 ago. 2008.

GAASTRA, W. *et al.* *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1–2, p. 1–16, nov. 2010.

GAULIN, E.; BOTTIN, A.; DUMAS, B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 3, p. 258–260, mar. 2010.

GOLDBERG, C. S. *et al.* Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). **Freshwater Science**, v. 32, n. 3, p. 792–800, set. 2013.

GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; WEST, P. VAN. The Biotrophic Stages of Oomycete–Plant Interactions. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2005. v. 57p. 217–243.

GRAHAM, J. B.; ISTOCK, C. A. Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 166, n. 3, p. 287–290, jan. 1978.

GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 147–152, mar. 2002.

HENDRIX, J. W. Sterols in Growth and Reproduction of Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 8, n. 1, p. 111–130, set. 1970.

HOU, H. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis reported in China, raising the alertness to this fungus-like infection: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, v. 15, n. 1, p. 619, dez. 2021.

IAN G. WILSON. WILSON 1997_Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.pdf. **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification**, v. 63, n. 10, p. 3741–3751, 1997.

AUSTWIK, P. K. C., COPLAND, J. W. Swamp Cancer. **Nature**, v. 250, p. 84, 1974.

JACKSON, M. *et al.* Using nested PCR to improve detection of earthworm eDNA in Canada. **Soil Biology And Biochemistry**, [S.L.], v. 113, p. 215–218, out. 2017.

JARA, M. *et al.* The Potential Distribution of *Pythium insidiosum* in the Chincoteague National Wildlife Refuge, Virginia. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 640339, 19 fev. 2021.

JUDELSON, H. S. Metabolic Diversity and Novelities in the Oomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 21–39, 8 set. 2017.

KEOPRASOM, N. *et al.* Vascular pythiosis in a thalassemic patient presenting as bilateral leg ulcers. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 25–28, 2013.

KITTICHOTIRAT, W. *et al.* Comparative Genomic Analysis Reveals Gene Content Diversity, Phylogenomic Contour, Putative Virulence Determinants, and Potential Diagnostic Markers within *Pythium insidiosum* Traits. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1–14, 27 jan. 2023

KLINTER, S.; BULONE, V.; ARVESTAD, L. Diversity and evolution of chitin synthases in oomycetes (Straminipila: Oomycota). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 139, p. 106558, out. 2019.

KUMAR, G., EBLE, J. E., GAITHER, M. R. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**. v. 20, [S.I.], p. 29–39, 2019.

LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J. G. M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 462–469, out. 2003.

LEAL, A. T. *et al.* Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 735–743, 2001.

LEVY-BOOTH, D. J. *et al.* Cycling of extracellular DNA in the soil environment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2977–2991, dez. 2007.

LÉZIART, T. *et al.* Effect of turbidity on water disinfection by chlorination with the emphasis on humic acids and chalk. **Environmental Technology**, v. 40, n. 13, p. 1734–1743, 7 jun. 2019.

LIANG, Z.; KEELEY, A. Filtration Recovery of Extracellular DNA from Environmental Water Samples. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 16, p. 9324–9331, 20 ago. 2013.

LIMA *et al.* JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 1., 2006, Petrolina. **Quantificação e pureza do DNA de videira por meio de espectrofotometria**. Petrolina: Embrapa, 2006.

LIMA, J. F. DA C. *et al.* Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 7, p. 690–697, jul. 2009.

Lorenzi, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. São Paulo: Nova Odessa. 640 pg. 2008.

MACHADO, G.; WEIBLEN, C.; ESCOBAR, L. E. Potential distribution of *Pythium insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1671–1679, dez. 2018.

MAR HTUN, Z. *et al.* Identification and Biotyping of *Pythium insidiosum* Isolated from Urban and Rural Areas of Thailand by Multiplex PCR, DNA Barcode, and Proteomic Analyses. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 242, 24 mar. 2021.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al.* Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 865–868, set. 2012.

MCGOWAN, J.; FITZPATRICK, D. A. Recent advances in oomycete genomics. Em: **Advances in Genetics**. [s.l.] Elsevier, 2020. v. 105p. 175–228.

MCKEE, D. *et al.* Response of freshwater microcosm communities to nutrients, fish, and elevated temperature during winter and summer. **Limnology and Oceanography**, v. 48, n. 2, p. 707–722, mar. 2003.

MENDOZA, Leonel. *Pythium insidiosum* and Mammalian Hosts. In: LAMOUR, Kurt; KAMOUN, Sophien (ed.). **Oomycete Genetics and Genomics**: diversity, interactions, and research rools. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. p. 387-405.

MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 8 fev. 2016.

MENDOZA, L.; AJELLO L.; MCGINNIS M. R. MENDOZA 1996_Infections caused by the oomycetous pathogen *pythium insidiosum*.pdf. **Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum***, v. 6, p. 151–164, 1996.

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, n. 2, p. 123–129, maio 1986.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **J. CLIN. MICROBIOL.**, p. 7, 1993.

MIKES, V. *et al.* Elicitins, Proteinaceous Elicitors of Plant Defense, Are a New Class of Sterol Carrier Proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, n. 1, p. 133–139, abr. 1998.

MILLER, R. I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, n. 1, p. 23–28, 1983.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. CLINICAL OBSERVATIONS ON EQUINE PHYCOMYCOSIS. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, n. 6, p. 221–226, jun. 1982.

NAGLER, M. *et al.* Why eDNA fractions need consideration in biomonitoring. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 7, p. 2458–2470, out. 2022.

- NETO, R. T. *et al.* Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 202–204, abr. 2010.
- NUNES, L. S. C.; SAITO, V. S.; CAMARGO, A. F. M. Local and regional drivers of macrophyte beta diversity in tropical coastal rivers. **Freshwater Science**, v. 40, n. 1, p. 138–150, 1 mar. 2021.
- PAUL, J. H.; MYERS, B. Fluorometric Determination of DNA in Aquatic Microorganisms by Use of Hoechst 33258. **APPL. ENVIRON. MICROBIOL.**, v. 43, p. 7, 1982.
- PAZ, G. S. DA *et al.* Outbreak of equine pythiosis in a southeastern region of Brazil: Environmental isolation and phylogeny. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 3, p. 1617–1624, maio 2022.
- PEREIRA, D. I. B. *et al.* Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 3, p. 301–306, mar. 2010.
- PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**, 16 dez. 2019.
- PESAVENTO, P. A. *et al.* Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 4, p. 538–541, jul. 2008.
- PITTIS, J. E.; COLHOUN, J. Isolation and Identification of Pythiaceae Fungi from Irrigation Water and their Pathogenicity to Antirrhinum, Tomato and Chamaecyparis lawsoniana. **Journal of Phytopathology**, v. 110, n. 4, p. 301–318, ago. 1984.
- PONCHET, M. *et al.* Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications?. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 56, n. 11–12, p. 1020–1047, 31 dez. 1999.
- POTT, V.J., FOSTER, R.B., LEON, B. Plantas Acuáticas: guía para principiantes. Disponível em: <https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/009_Amer_Trop-Aquatics_v1.7_1.pdf>. Acesso em: 10 dez 2022
- RAHMAN, K. M.; SAROWAR, M. N. Molecular characterisation of oomycetes from fish farm located in Mymensingh sadar during summer. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, v. 2, n. 2, p. 236–246, 9 ago. 2016.
- RAVISHANKAR, J. P. *et al.* Mechanics of Solid Tissue Invasion by the Mammalian Pathogen Pythium insidiosum. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, n. 3, p. 167–175, dez. 2001.
- REIS, A. *et al.* Espécies fitopatogênicas de Phytophthora. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [S.L.], p. 56-78, 12 jan. 2023.
- REIS-GOMES, A. *et al.* Epidemiologia de micoses, pitiose e micotoxicoses em equinos no sudeste do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 1110–1116, jun. 2018.
- RENSHAW, M. A. *et al.* The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 1, p. 168–176, jan. 2015.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950

ROBSON, H. L. A. *et al.* Fine-tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 4, p. 922–932, jul. 2016.

ROCHA, C. M. C. *et al.* Macrófitas Aquáticas como Parâmetro no Monitoramento Ambiental da Qualidade da Água (Macrophytes as a Parameter in the Environmental Monitoring of Water Quality). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 5, n. 4, p. 970, 11 dez. 2012.

SANTOS, C. A. P. DOS. Macrófitas biondicadoras em trecho urbano do Rio Grande – oeste da Bahia. **Caderno de Pesquisa**, v. 29, n. 2, 5 maio 2017.

SANTURIO, J. M. *et al.* Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 1, 27 jun. 2018.

SAVIDOV, N. *et al.* Highly oxygenated isoprenoid lipids derived from fungi and fungal endophytes: Origin and biological activities. **Steroids**, v. 140, p. 114–124, dez. 2018.

SCHENK, John J. *et al.* What is the “modified” CTAB protocol?: characterizing modifications to the ctab dna extraction protocol. **Applications In Plant Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 1-11, maio 2023.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 27 mar. 2012

SCHRIEWER, A.; WEHLMANN, A.; WUERTZ, S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 1, p. 16–21, abr. 2011.

SHEN, D. *et al.* Infection mechanisms and putative effector repertoire of the mosquito pathogenic oomycete *Pythium guiyangense* uncovered by genomic analysis. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 4, p. e1008116, 24 abr. 2019.

SHIPTON, W. A.; MILLER, R. I.; LEA, I. R. Cell wall, zoospore and morphological characteristics of Australian isolates of a *Pythium* causing equine phycomycosis. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 79, n. 1, p. 15–23, ago. 1982.

SOMERVILLE, C. C. *et al.* Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 548–554, mar. 1989.

SPENS, J. *et al.* Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 635–645, maio 2017.

SPRING, O. *et al.* Biological Characteristics and Assessment of Virulence Diversity in Pathosystems of Economically Important Biotrophic Oomycetes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 37, n. 6, p. 439–495, 2 nov. 2018.

STRICKLER, K. M.; FREMIER, A. K.; GOLDBERG, C. S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. **Biological Conservation**, v. 183, p. 85–92, mar. 2015.

SUPABANDHU, J. *et al.* Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 41–52, jan. 2008.

TABERLET, P. *et al.* Environmental DNA: ENVIRONMENTAL DNA. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1789–1793, abr. 2012.

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2657–2665, ago. 1993.

THINES, M. Oomycetes. **Current Biology**, v. 28, n. 15, p. R812–R813, ago. 2018.

THOMAZ, S. M. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. **Planta Daninha**, v. 20, n. spe, p. 21–33, 2002.

THOMSEN, P. F.; WILLERSLEV, E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**, v. 183, p. 4–18, mar. 2015.

TOJO, M. *et al.* *Pythium polare*, a new heterothallic oomycete causing brown discolouration of *Sanionia uncinata* in the Arctic and Antarctic. **Fungal Biology**, v. 116, n. 7, p. 756–768, jul. 2012.

TURNER, C. R. *et al.* Particle size distribution and optimal capture of aqueous macrobial eDNA. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 7, p. 676–684, jul. 2014.

VAN DEN BERG, A. H. *et al.* The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 33–42, ago. 2013.

VANITTANAKOM, N. *et al.* Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 321–326, maio 2014.

VILELA, R. *et al.* *Pythium insidiosum* isolated from infected mosquito larvae in central Brazil. **Acta Tropica**, v. 185, p. 344–348, set. 2018.

VILLA, M. E. C. dalla; SAMPAIO, T. V. M. Variabilidade espacial e temporal dos parâmetros físico-químico em ambiente lêntico. **Boletim de Geografia**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 69–80, 23 dez. 2016

WATANABE, M. J. *et al.* Equine pythiosis: Report of 28 cases from São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 909, 22 abr. 2015.

WAWRA, S. *et al.* Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 685–691, dez. 2012.

WEIBLEN, C. *et al.* New insights on evolutionary aspects of *Pythium insidiosum* and other peronosporaleans. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 395–406, abr. 2020.

WHITE, T. J.; Bruns, T. D.; Lee S. B.; Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, n. May 2014, p. 315–322, 1990.

WILLIAMS, K. E.; HUYYVAERT, K. P.; PIAGGIO, A. J. No filters, no fridges: a method for preservation of water samples for eDNA analysis. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 298, dez. 2016.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741–3751, 1997.

YOLANDA, H.; KRAJAEJUN, T. Global Distribution and Clinical Features of Pythiosis in Humans and Animals. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 2, 11 fev. 2022.

ŽAKELJ-MAVRIČ, M. *et al.* Steroid hormone signalling system and fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 4, p. 637–642, dez. 1995.

ZAMBRANO, C. G. *et al.* Isolamento e caracterização de espécies de *Pythium* de ambientes aquáticos no Estado do Rio Grande do Sul e avaliação da patogenicidade em modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 459–464, maio 2017.

ZARO, D. *et al.* *Pythium insidiosum* em equino: Relato de caso. **Pubvet**, v. 12, n. 12, p. 1–8, dez. 2018.