

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 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

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 quimiotática 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

Oomicetos

Os oomicetos são uma classe de microrganismos eucarióticos, multicelulares, com filamentos cenocíticos, geralmente incolores e possuem diversas formas de vida, podendo ser saprotrófico ou patogênicos (JUDELSON, 2017). Os oomicetos são organismos complexos, que apresentam semelhanças com os fungos, como crescimento vegetativo em forma de hifas, o sistema de nutrição heterotrófico e papéis ecológicos similares. No entanto, há divergências morfológicas significativas que distinguem oomicetos de fungos, sendo a principal, relacionada à composição da parede celular (ALEXOPULOS & BLACKWELL, 1996) (JUDELSON, 2017) (KLINTER *et al.*, 2019). A parede celular de fungos (Eumycota) apresenta como estruturas componentes a quitina e diversos grupos de α e β glucanas, enquanto os oomicetos apresentam pouca ou ausência de quitina e grupos restritos de β glucanas compondo sua parede celular. Além da composição da parede, os fungos e oomicetos divergem estruturalmente quanto a presença de esteróis na membrana plasmática, sendo o primeiro capaz de sintetizar esse grupo de moléculas (LATIJNHOUWERS; DE WIT; GOVERS, 2003). Em eucariotos, os esteróis são moléculas importantes para diversas rotas metabólicas, sinalizações e permeabilidade celular, que implicam na adaptação do organismo ao ambiente. Em oomicetos, lipídios e ácidos-graxos de cadeia longa possivelmente substituem a função dos esteróis, apesar de alguns grupos sintetizarem essa substância (ŽAKELJ-MAVRIČ *et al.*, 1995) (GAULIN; BOTTIN; DUMAS, 2010) (JUDELSON, 2017) (SAVIDOV *et al.*, 2018). Parte dos oomicetos são considerados seres auxotróficos, e, portanto, incapazes de sintetizar determinadas substâncias essenciais para seu desenvolvimento. Uma das substâncias que alguns oomicetos são incapazes de sintetizar são esteróis, os quais são descritos como importantes no desenvolvimento de estruturas reprodutivas de diversos grupos de oomicetos (HENDRIX, 1970) (JUDELSON, 2017). Devido a incapacidade dessas moléculas, alguns oomicetos, como gêneros *Phytophthora* e *Pythium*, necessitam incorporá-las do ambiente, podendo ser obtido através da infecção de hospedeiros. Em organismos fitopatogênicos, como gêneros *Phytophthora* e *Pythium*, foi identificada uma proteína extracelular (elicitina) que atua na captação de esteróis, por meio da indução da morte celular do hospedeiro, a qual tem por finalidade expor tais substâncias ao meio e possibilitar sua assimilação (HENDRIX, 1970) (MIKES *et al.*, 1998) (PONCHET *et al.*, 1999) (WAWRA *et al.*, 2012) (LATIJNHOUWERS; DE WIT; GOVERS, 2003) (DEREVNINA *et al.*, 2016).

As diferenças estruturais da parede celular de fungos e oomicetos estão relacionadas com suas origens evolutivas. Diferente dos fungos, que são evolutivamente mais próximos dos animais,

os oomicetos possuem relação filogenética mais próxima às algas pardas e diatomáceas, pertencentes ao Reino Stramenopila (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996) (GAASTRA *et al.*, 2010) (BEAKES; GLOCKLING; SEKIMOTO, 2012) (SPRING *et al.*, 2018) (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019).

De forma geral, oomicetos estão classificados como saprotróficos-oportunistas, devido sua capacidade de infectar diversos organismos como plantas, algas e diferentes espécies de animais, incluindo insetos, peixes e mamíferos (BRUNO; WEST; BEAKES, 2011) (RAHMAN; SAROWAR, 2016) (WEIBLEN *et al.*, 2020). Tal grupo de microrganismo pode ser encontrado em diferentes ecossistemas e estão dispersos em todos continentes, incluindo Antártica (TOJO *et al.*, 2012) (JUDELSON, 2017) (THINES, 2018). Devido sua generalidade em infectar diferentes tipos de organismos, os oomicetos são responsáveis por grandes perdas econômicas relacionadas às áreas de agricultura, agropecuária e aquicultura (LEAL *et al.*, 2001) (VAN DEN BERG *et al.*, 2013). Muitas espécies de oomicetos possuem potencial patogênico para diferentes tipos hospedeiros, sendo que as ordens Saprolegniales, Peronosporales e Pythiales possuem grande escopo de possibilidades. Na ordem Peronosporales há organismos responsáveis por grandes perdas econômicas devido acometimento de plantações de soja e batata, como ocorreu no evento histórico conhecido como “fome da batata”, que ocorreu a Irlanda durante século 19. Em Saprolegniales encontra-se oomicetos que são agentes etiológicos de doenças de peixes, anfíbios e crustáceos, as quais levam a mortandades em aquiculturas (MCGOWAN; FITZPATRICK, 2020). Como representante da ordem Pythiales, destaca-se o gênero *Pythium*, representante de espécies fitopatogênicas e patógenas de mamíferos (MENDOZA, 2009) (RADMER *et al.*, 2016) (WEIBLEN *et al.*, 2020).

Pitiose: uma doença emergente

Diversos casos de uma doença granulomatosa, acometendo equinos, principalmente na região distal das pernas, tem sido descrito ao longo da história e em diferentes continentes. Relatos de doenças com as mesmas características registraram diferentes nomes ao longo do tempo, como “*bursattee*”, “*swamp cancer*”, “*hyphomycosis*”, dentre outros, que procedem de países como Austrália, Nova Guiné, Estados Unidos, Indonésia e Japão (SHIPTON; MILLER; LEA, 1982) (MILLER; CAMPBELL, 1982) (DE COCK *et al.*, 1987). O primeiro caso registrado da doença foi feito por Smith (1884), a partir de uma amostra de ferida observada em microscópio, onde constatou a presença de hifas e presumiu que tal organismo poderia estar presente no solo.

O termo pitiose foi proposto por Chandler *et al.* (1980), como sendo mais apropriado para doença causada por *Pythium* sp. em mamíferos. O gênero passou a ser reconhecido como possível agente etiológico da doença a partir de observações morfológicas e de comportamento de zoósporos *in vitro*, que eram similares as do até então agente etiológico *Hyphomyces destruens*, antes classificado como zigomiceto (AUSTWIK & COPLAND, 1974) (MENDOZA, L.; AJELLO L.; MCGINNIS M. R., 1996). Suspeitas de que os agentes etiológicos poderiam se tratar de uma mesma espécie foram levantadas e posteriormente verificou-se, de fato, se tratar de uma espécie de oomiceto do gênero *Pythium*, a qual foi nomeada *Pythium insidiosum* por DE COCK *et al* (1987).

A pitiose apresenta diversas manifestações clínicas, sendo mais recorrentes lesões cutâneas e subcutâneas com formação de feridas granulomatosas em diferentes espécies de animais, infecção do trato gastrointestinal, ceratites em humanos, e forma sistêmica, quando ocorre disseminação do patógeno no organismo, acometendo vasos sanguíneos (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993) (GAASTRA *et al.*, 2010) (PEREIRA *et al.*, 2010) (HOU *et al.*, 2021) (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022). Segundo MAR HTUN *et al.* (2021), o grande aumento de casos de pitiose que tem sido relatado faz dessa doença um problema de saúde pública. O número total de casos registrados no Brasil o coloca em segundo lugar no ranking de casos reportados da doença em todo o mundo, com 20,07% dos relatos e atrás somente do Estados Unidos, com 44,97% dos casos (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022). A pitiose tem ampla distribuição no Brasil, com registros de casos nas regiões norte (BARBOSA *et al.*, 2023), nordeste (SALLIS; PEREIRA; RAFFI, 2003) (CARRERA *et al.*, 2013), sudeste (WATANABE *et al.*, 2015), sul (PEREIRA *et al.*, 2010) (BERNARDO *et al.*, 2015) e centro-oeste (DOS SANTOS *et al.*, 2014).

O cavalo (*Equus caballus*) é a espécie mais acometida pela pitiose no Brasil (Santurio *et al.*, 2006). De acordo com dados de Yolanda & Krajaejun (2022), o Brasil soma 577 casos de pitiose equina, contra 266 da doença em outras espécies de animais. Os animais com acesso a fontes de água e em regiões favoráveis ao estabelecimento do patógeno têm maior exposição a um ambiente possivelmente infectado por zoósporos de *P. insidiosum*, que são atraídos até a pele do animal. Nos cavalos, as regiões do corpo mais afetadas são membros e região abdominal, em que se desenvolvem lesões isoladas ou multifocais com presença de pequenos fragmentos de uma massa rígida, denominadas “*kunkers*”, que são granulomas, cercados por eosinófilos, contendo hifas viáveis do patógeno em seu interior (GAASTRA *et al.*, 2010) (WATANABE *et al.*, 2015) (MENDOZA, 2016). Na região de Botucatu/SP se tem relatado 33

casos de pitiose equina, registrados entre os anos de 2007 e 2018. Dentre esses casos, foi reportado um surto da doença às margens do rio Tietê, com acometimento de cinco cavalos (WATANABE *et al.*, 2015) (PAZ *et al.*, 2022). Apesar de sua prevalência no país, a pitiose não é uma doença de notificação obrigatória, podendo indicar um número subestimado de casos da doença (REIS-GOMES *et al.*, 2018).

Agente etiológico da pitiose

Entende-se por agente etiológico um organismo capaz de comprometer a saúde de um outro ser vivo através do acometimento de uma doença. A espécie *Pythium insidiosum* foi descrita por DE COCK *et al.* (1987), a partir da comparação morfológica de estruturas vegetativas e reprodutivas de cepas de *Pythium* spp., isoladas de animais lesionados em diferentes países, com espécies do gênero que eram conhecidamente patógenas de plantas (*P. gracile*, *P. monospermum*, *P. graminicola*, *P. debaryanum*). Assim como outros oomicetos da ordem Pythiales, *P. insidiosum* também possui capacidade de infectar plantas e fragmentos de substratos vegetais (MILLER, 1983) (GAASTRA *et al.*, 2010). Como representante do Reino Stramenopila, classe dos oomicetos (Oomycetes) e ordem Pythiales, família Pythiaceae, o microrganismo *P. insidiosum* é relatado como principal agente etiológico da pitiose, uma doença de natureza granulomatosa que acomete diferentes espécies de animais, incluindo cães, gatos, equinos, bovinos, ovinos, animais silvestres e humanos (BOSCO *et al.*, 2005) (LEAL *et al.*, 2001) (SANTURIO *et al.*, 2018) (PEREIRA *et al.*, 2010) (WATANABE *et al.*, 2015) (GAASTRA *et al.*, 2010) (DYKSTRA *et al.*, 1999) (PAZ *et al.*, 2022). Para além de infecções em mamíferos, VILELA *et al.* (2018) reportaram três isolados de *P. insidiosum* em larvas de mosquito *Aedes aegypti*, sendo o primeiro relato de infecção de insetos pelo oomiceto no Brasil.

O ciclo de vida do patógeno se dá em ambiente aquático e se baseia em reprodução sexuada por oogamia e fase assexuada, em que ocorre a produção de estruturas reprodutivas denominadas zoósporos, importantes para sua manutenção no ambiente (SANTURIO *et al.*, 2018) (Figura 1).

Os zoósporos de *P. insidiosum* são morfológicamente descritos como células únicas e nucleadas, sem parede celular e biflageladas, sendo um flagelo anterior (*tinsel flagela*) e outro posterior (*whiplash flagella*). O flagelo posterior desempenha função natatória, enquanto o flagelo anterior auxilia no direcionamento, que pode ser interrompido por mudanças aleatórias de direção (SHIPTON; MILLER; LEA, 1982) (GAASTRA *et al.*, 2010). Os zoósporos, ao se deparar com um substrato propício para seu encistamento, secretam substâncias em sua

superfície, possivelmente glicoproteínas, que podem estar associadas à adesão do zoósporo ao substrato e contribuir como fator de virulência para infecção de possíveis hospedeiros (MENDOZA; MCGINNIS, 1996) (GAASTRA *et al.*, 2010) (SANTURIO *et al.*, 2018). Também foram identificadas proteases associadas às patogenicidades de *P. insidiosum*, que atua interferindo na resistência de tecidos como a pele (RAVISHANKAR *et al.*, 2001) (DAVIS *et al.*, 2006). Após encistamento, o zoósporo perde seus flagelos e se inicia o desenvolvimento do tubo germinativo para posterior formação de apressório, estrutura a qual auxilia na invasão da célula hospedeira, propiciando o crescimento de hifas de penetração (GRENVILLE-BRIGGS; WEST, 2005) (SHEN *et al.*, 2019).

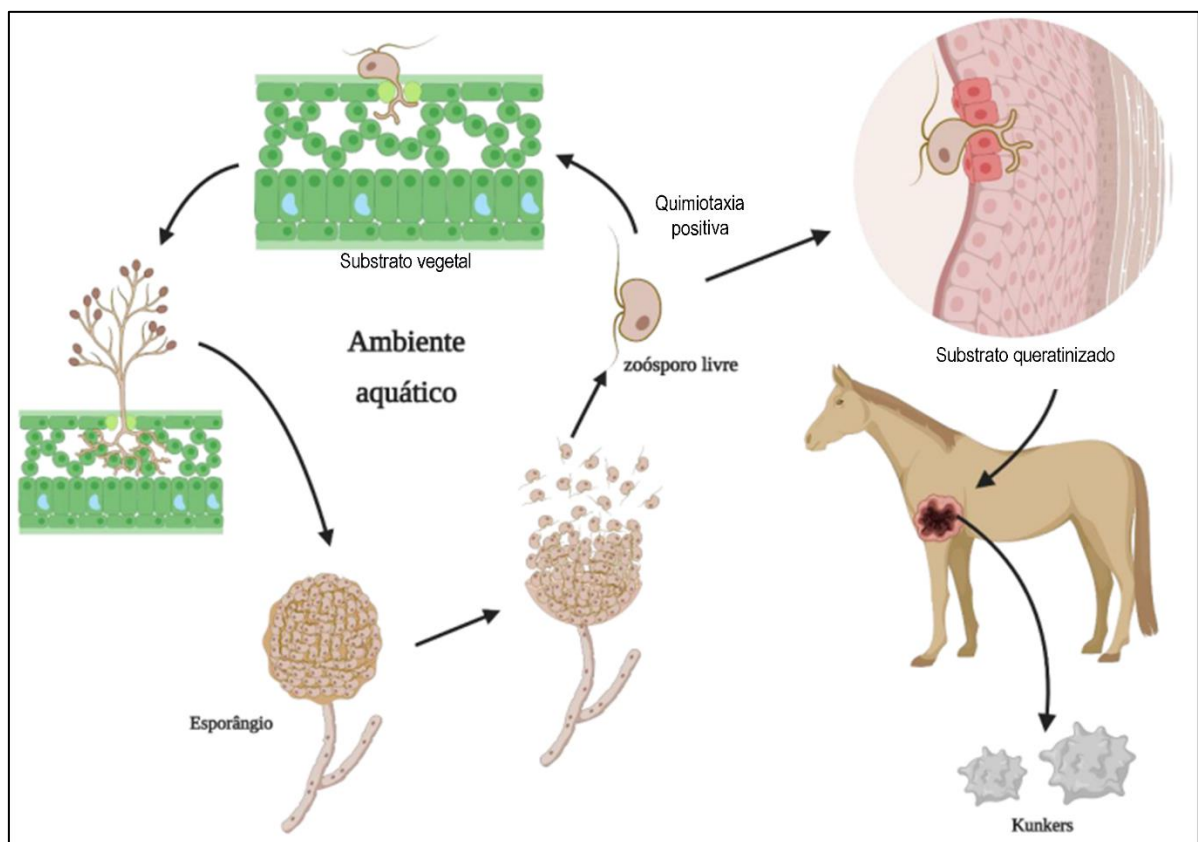


Figura 1: Ciclo de vida do *Pythium insidiosum* no ambiente. Adaptado de Paz *et al.* (2022).

Em 1983, Miller verificou que zoósporos de *P. insidiosum* são atraídos por cabelo e tecidos humano e equino, além de folhas de diferentes espécies vegetais. Apesar de todos substratos indicarem poder de atração em relação aos zoósporos, os de origem animal e plantas da família Poaceae e gênero *Nymphae* sp., indicaram exercer maior grau de atração e induzir maior produção de esporângios ao serem colonizadas, quando comparados a fragmentos de plantas de espécies desconhecidas (MENDOZA; HERNANDEZ & AJELLO 1993). Em estudo similar, MILLER (1983) utilizou fragmentos de folha, caule e raiz de plantas das espécies *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp. e *Nymphaea gigantea* para induzir o encistamento de

zoósporos de *Pythium* spp., obtidos de cepas isoladas de casos clínicos e ambientais. Observou-se a colonização de fragmentos de pelos de animais em dois minutos de exposição e fragmentos de *N. gigantea*, após cinco minutos de exposição aos zoósporos. As demais espécies não demonstraram desempenhar poder de atração sobre os zoósporos.

No crescimento vegetativo *in vitro*, o organismo apresenta como características morfológicas crescimento micelial em forma radial, com bordas irregulares, de coloração branca a bege e micélio aéreo curto. Em microscopia, tem como característica morfológica hifas hialinas de diâmetro entre 4 e 10 µm, com ramos em ângulo agudo, esparsamente septadas e ausência de estrutura produtora de esporos (MENDOZA, L; AJELLO L.; MCGINNIS M. R., 1996) (BOSCO *et al.*, 2008). Os primeiros isolados clínicos do patógeno foram obtidos de feridas granulomatosas de equinos acometidos pela doença, sendo o primeiro descrito por Haan & Hoogkaner, em 1903 (AUSTWIK & COPLAND, 1974) (MENDOZA; ALFARO, 1986).

Outra espécie, *Pythium aphanidermatum*, também foi descrita como potencial agente etiológico da pitiose (CALVANO *et al.*, 2011). Com a inoculação de hifas de *P. aphanidermatum* em coelhos, ZAMBRANO *et al.* (2022) detectaram potencial patogênico da espécie, a partir da identificação de lesões com características diferentes das causadas por *P. insidiosum*, bem como menor resposta humoral, mediada por anticorpos, indicando uma resposta imunológica mais branda. Apesar do potencial em desencadear infecção em mamífero, mais estudos necessitam ser realizados para elucidar se há uma relação parasita-hospedeiro como ocorre com *Pythium insidiosum*.

Deteção de *Pythium insidiosum* no ambiente

Com diversos casos de feridas similares acometendo cavalos ao longo do tempo e causadas por organismos idênticos, MILLER (1983) propôs um ciclo de vida para *Pythium* sp., considerando-o patógeno da doença. Para tanto, de dez tentativas, foram obtidos dois isolados ambientais para identificação e comparação com isolados clínicos, do ponto de vista morfológico e do comportamento dos zoósporos quando expostos a substratos de origem animal e vegetal. A partir da observação do comportamento dos zoósporos e colonização de diferentes substratos, foi proposto um ciclo de vida abarcando reservatórios naturais do patógeno, incluindo equídeos como peça importante na disseminação do organismo no ambiente. Os *kunkers*, por manter hifas viáveis em seu interior e serem facilmente desprendidos da ferida, contribuem com a disseminação do patógeno ao cair no ambiente aquático, fazendo com que o

ciclo reinicie com desenvolvimento de estrutura reprodutiva, liberação de zoósporos e colonização de plantas aquáticas (DOS SANTOS *et al.*, 2014) (SANTURIO *et al.*, 2018).

Estudos e *insights* para associar detecção de *Pythium* sp. a fatores ambientais são relevantes para compreender de forma integrada o ciclo de vida do patógeno ao longo do tempo. MILLER & CAMPBELL (1982) sugeriram que temperaturas do ar entre 30 e 40°C seria condição relevante para estabelecimento do patógeno no ambiente, por observar grande número de casos durante o verão na Austrália, uma região tropical. À temperatura, os autores atribuem ser importante para produção de zoósporos. Períodos de chuva também foram relacionados à presença do organismo, como fator que favorece a manutenção do meio, necessário para seu crescimento. Seguindo a mesma linha de pensamento, diversos autores corroboram a temperatura e pluviosidade como fatores importantes para o estabelecimento de *P. insidiosum* no ambiente, sobretudo em regiões de solo úmido, em que há acúmulo de água e vegetação aquática (SUPABANDHU *et al.*, 2008) (GAASTRA *et al.*, 2010) (DOS SANTOS *et al.*, 2014) (SANTURIO *et al.*, 2018) (JARA *et al.*, 2021) (LEAL *et al.*, 2001). Levantamento feito por MARCOLONGO-PEREIRA *et al.* (2012) mostra que entre 1979 e 2011 foram confirmados 63 casos de pitiose equina, atendidos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sendo o maior número de casos registrados entre os meses de março e junho, que representam a transição entre verão e outono. Nesse mesmo intervalo de tempo, em pelo menos um dia do mês em que pode ter ocorrido a infecção do animal, foi registrado temperatura máxima do ar próxima de 30°C. Casos de pitiose também são registrados em meses de temperatura amena, como no inverno, no entanto surtos da doença são comuns em períodos de verão chuvoso (DOS SANTOS *et al.*, 2014). Weiblen *et al.* (2017) realizaram coletas de 186 amostras de água no Estado do Rio Grande do Sul, para isolamento convencional de *Pythium* spp. utilizando cabelo humano como isca e meio de cultura seletivo. Os resultados demonstram taxa de sucesso no isolamento de 14,5% para microrganismos com características macro e microscópicas condizentes com o gênero, sendo maior número de isolados foram obtidos nas estações verão e outono, com destaque para o mês de abril em que a temperatura tende a ser mais alta. Utilizando mesmo método, 500 amostras de água provenientes de diferentes locais da Tailândia foram submetidas à técnica de isolamento e foi detectado crescimento de hifas compatíveis com *Pythium* spp. em 12,8% delas, empregando-se meio de cultura SAB acrescido de antibióticos (MAR HTUN *et al.*, 2021). Assim sendo fica evidente que, além da temperatura, a umidade e pluviosidade podem ser considerados fatores

limitantes para desenvolvimento e distribuição de *Pythium* spp. no ambiente (JARA *et al.*, 2021).

Ambientes aquáticos, sobretudo margens de rios e reservatórios, que possuem barreiras geográficas bem definidas, baixa movimentação de água em sua margem, envoltos de vegetação e frequentados por diferentes animais, podem ser propícios para estabelecimento do patógeno no ambiente (VAN DEN BERG *et al.*, 2013) (MAR HTUN *et al.*, 2021). Em águas estagnadas, a temperatura é variável de acordo com a profundidade do solo, irradiação solar na lâmina d'água, a hora do dia e presença ou não de ventos. Mesmo com interferência desses fatores, a temperatura da água tende a ficar acima da temperatura do ar em dias frios e muito próxima em dias quentes, o que pode ser atribuído à sua alta capacidade de reter calor e por isso apresentar baixa variação térmica ao longo do dia (ANGELOCCI; NOVA, 1995). No entanto, outros fatores podem influenciar a manutenção da temperatura no ambiente, como atividades metabólicas de microrganismos e plantas aquáticas ou macrófitas aquáticas.

As macrófitas aquáticas desempenham importante papel ecológico em águas continentais, fornecendo habitat, abrigo e sendo fonte de nutrientes para diferentes organismos. As macrófitas possuem variedade na forma de vida, que favorece sua ocupação em diferentes ambientes por meio da dispersão de propágulos ou mesmo por deslocamento de indivíduos através do curso de rios. Além da influência na temperatura da água, as macrófitas podem influenciar na diversidade de organismos no local em que se estabelecem, devido formação de micro habitats que servem de fonte de nutrientes para algas e microrganismos e esconderijo para outras espécies de animais (ROCHA *et al.*, 2012) (ALAHUHTA *et al.*, 2021). As macrófitas aquáticas também fornecem grande quantidade de biomassa para ambientes aquáticos, a citar o exemplo de *E. crassipes* e *Salvinia* sp., que são macrófitas flutuantes e de rápido crescimento, com capacidade de dobrar sua massa seca entre 3 e 7 dias (CHAMBERS *et al.*, 2008). A decomposição de matéria orgânica produz substâncias úmicas, que, juntamente com microrganismos, algas e outras substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, aumentam a turbidez da água (LEZIART *et al.*, 2019). Além disso, há macrófitas aquáticas com potencial farmacológico e alelopático, sendo esse último relacionado à inibição do crescimento de bactérias e algas filamentosas através da secreção compostos oriundos de seu metabolismo secundário, como ocorre em *E. crassipes* (SHANAB *et al.*, 2010). Carvalho *et al.* (2003) fez o levantamento de plantas aquáticas ao longo do rio Tietê, na porção próxima ao reservatório de Barra Bonita/SP. Nesse trabalho foram amostrados 335 pontos, em que foram avaliadas as espécies presentes no trajeto, frequência dessas espécies e seu potencial de infestação. Algumas

das espécies com maior frequência de registros e potencial de infestação foram *E. crassipes*, *Brachiaria* spp., *Pistia stratiotes*, *Salvinia* spp. e *Polygonum lapathifolium*. Estudo realizado por McKee *et al.* (2003) demonstra haver correlação entre presença de macrófitas aquáticas, temperatura e pH. Em experimento controlado, foi observada uma tendência na diminuição do pH conforme ocorre o incremento de temperatura na presença de macrófitas. Esteves (2011) argumenta que o pH é variável de acordo com múltiplos fatores associados, de origem natural e/ou artificial, se tornando uma das variáveis ambientais mais difíceis de ser interpretada. Somado a isso, um relatório apresentado pela Fundação SOS Pro-Mata Atlântica (2022) indicou presença de poluição difusa, ou seja, oriunda de diversas fontes geradoras ao longo do rio Tietê em trechos da região de Botucatu/SP, e transferência de cargas de poluição e sedimentos contaminados oriundas de porções a jusante do rio, que podem afetar na temperatura e pH da água nesse trecho.

Estudo realizado por JARA *et al.* (2021) na Virginia (Estados Unidos da América), relata isolamentos de *Pythium insidiosum*, com maior número de isolados nos meses de junho e julho. O Estudo foi conduzido no *Chincoteague Wildlife Refuge*, onde foram relatados casos de pitiose em pôneis de vida livre. Junto ao isolamento do patógeno, foram aferidas temperatura, salinidade da água e feita identificação da vegetação presente nos locais amostrados, que indicam ambientes de transição ecológica, poças intermitentes e lagos. Identificou-se que mesmo em regiões com água transitória, é possível detecção do oomiceto no solo, o que se atribui à resistência de oósporos que podem germinar quando a área é alagada. Em relação a vegetação, a área de maior adequação para presença do patógeno foi em locais com plantas submersas e com característica emergente (JARA *et al.*, 2021).

O método convencional de isolamento do patógeno se dá através do uso de iscas de queratina, como ecdise de serpentes, as quais são acondicionadas em alíquota de água supostamente contendo zoósporo do oomiceto. Após um período de incubação para encistamento dos zoósporos, as iscas são transferidas para meio seletivo contendo fármacos, para inibir o crescimento de outros microrganismos, como bactérias e fungos (SUPABANDHU *et al.*, 2018). Devido à baixa eficácia de métodos convencionais para detecção e isolamento de *P. insidiosum* no ambiente (ZAMBRANO *et al.*, 2017), métodos moleculares têm sido empregados a fim de identificar de forma indireta a presença ou rastros no organismo no ambiente e auxiliar na compreensão de sua distribuição geográfica e epidemiologia (VANITTANAKOM *et al.*, 2014).

Técnicas moleculares de identificação e monitoramento ambiental

Na microbiologia é documentada a dificuldade em se estudar biodiversidade de microrganismos presentes no ambiente, pois muitos deles não são cultiváveis. Tal condição faz necessária aplicação de outras técnicas, como a biologia molecular, para detectar a existência de determinados microrganismos (SOMERVILLE *et al.*, 1989). Um dos primeiros relatos do uso de biologia molecular em amostras ambientais foi feito por PAUL & MYERS (1982), ao descreverem um método de obtenção de DNA no ambiente aquático, para inferir a abundância de microrganismos utilizando técnica de filtragem com filtros de fibra de vidro e triacetato de celulose. OGRAM; SALER & BARKAY (1987) foram os primeiros a fazer referência a *environmental* DNA, ao apresentar um método para obter DNA de sedimentos coletados em diferentes ambientes aquáticos. A partir dos anos 2000 o termo “*environmental* DNA” (eDNA) passou a ser difundido (TABERLET *et al.*, 2012) (TURNER *et al.*, 2014). O termo se refere ao DNA presente no ambiente (como água, solo e ar) e que pode ser obtido sem que se isole um organismo em específico. O eDNA pode ser definido como uma mistura complexa de DNA de fita simples e/ou DNA de fita dupla disposta no ambiente, proveniente de organismos vivos ou células mortas que tiveram seu material genético exposto após ruptura de estruturas celulares (LEVY-BOOTH *et al.*, 2007) (TABERLET *et al.*, 2012) (NAGLER *et al.*, 2022).

Moléculas de DNA expostas ao ambiente estão sujeitas ao processo de degradação, influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, como temperatura, pH, exposição à luz ultravioleta (UV), matéria orgânica dissolvida, enzimas e comunidade microbiana (BLUM; LORENZ; WACKERNAGEL, 1997) (DELL'ANNO; CORINALDESI, 2004) (BARNES *et al.*, 2014) (TSUJI *et al.*, 2017). Graham & Istock (1978) relatam a possível influência de restos de membranas, proteínas e partículas de solo na proteção de moléculas de DNA e na atividade de enzimas degradantes de DNA. Os autores sugerem que interações químicas por adsorção ocorrem entre essas substâncias presentes no meio e moléculas de DNA, tanto quanto com enzima DNase (desoxirribonuclease), assim conferindo proteção contra ação dessas enzimas. Isso se deve à interação de moléculas de DNA com substâncias presentes no ambiente, como sedimentos e substâncias orgânicas, que acontece por meio do processo de adsorção. No entanto, o processo de adsorção entre DNA e sedimentos ou solo pode ser influenciado por outros fatores, como pH, mineralogia do adsorvente e tamanho do fragmento (OGRAM *et al.*, 1988). Ambientes com pH ácido tendem a favorecer o processo adsorção de DNA (LIANG; KEELEY, 2013). A ampla gama de fatores associados à persistência da molécula de eDNA no ambiente implica no sucesso de sua recuperação em diferentes tipos de ambientes, como

aquático e terrestre (NIELSEN *et al.*, 2007) (BENG; CORLETT, 2020). Simulando condições de um ambiente natural, Romanowski; Lorenz & Wackernagel (1993) conduziram experimentos que permitiram compreender a adsorção de moléculas de DNA lineares e superenroladas com partículas de minerais, bem como avaliar o grau de proteção conferido pelo fenômeno frente à exposição de DNase. Para isso, os pesquisadores preparam um microcosmo com amostras de água e sedimentos provenientes de um aquífero, onde o material genético foi exposto. Ambas conformações da molécula de DNA foram adsorvidas às partículas do sedimento, o que lhes conferiu proteção contra ação da enzima, sendo necessária uma concentração de DNase 1000 vezes maior em comparação com moléculas de DNA semelhantes dispostas em solução livre de partículas. O tamanho da molécula de eDNA também é relevante para sua manutenção no ambiente. Em experimento avaliando a relação entre tamanho de fragmentos de DNA e adsorção com partículas de solo, Ogram *et al* (1994) constataram que fragmentos de DNA curtos (2,9 kbp) tendem a permanecer no ambiente por mais tempo quando comparados com fragmentos maiores (23 kbp). Os autores concluem que fragmentos menores de DNA tem maior área adsorção com a matriz a qual está exposto, o que confere maior proteção ao ataque de enzimas que degradam o DNA.

Estudos recentes apresentam evidências de que a taxa de degradação de eDNA em ambientes aquáticos é alta, no entanto existem divergências quanto ao tempo de persistência dessas moléculas no ambiente. Diferentes estudos conduzidos sob condições controladas evidenciam diferenças no tempo de decaimento do eDNA na água após retirada do organismo alvo de detecção do meio. Dejean *et al* (2011) conduziu um experimento em aquários contendo água proveniente de um lago, onde que avaliou a persistência de eDNA proveniente de girinos da espécie *Rana catesbeiana* (Rã-touro-americana) após serem retirados do ambiente. Seus resultados demonstram que em até 25 dias é possível detectar o material genético dos organismos. Estudo semelhante, realizado por Goldberg *et al* (2013), teve como resultado a detecção de DNA espécie de caramujo *Potamopyrgus antipodaru* até 21 dias após sua retirada do ambiente. A partir de amostras de água provenientes de uma lagoa, Thomsen *et al* (2012) avaliaram a taxa de decaimento de eDNA de duas espécies de anfíbios em estágio larval, que atingiu o limar de detecção entre uma e duas semanas. Esses estudos não mensuraram o efeito de fatores ambientais à persistência da molécula.

Ambientes aquáticos podem ser classificados de acordo com a concentração de nutrientes orgânicos e inorgânicos e matéria orgânica disponíveis, dentre outros fatores. São classificados como eutróficos corpos d'água com alta concentração de nutrientes e de matéria

orgânica e baixa oxigenação devido processos de decomposição, enquanto ambientes oligotróficos são pobres em nutrientes e matéria orgânica e possuem boa oxigenação. Os chamados ambientes distróficos apresentam alta concentração de matéria orgânica húmica, proveniente de outros ambientes (ESTEVES, 2011). A fim de correlacionar fatores bióticos e abióticos com a persistência de eDNA no ambiente, Eichmiller; Best & Sorensen (2016) avaliaram a interferência de temperatura e grau de trofia da água na degradação de eDNA em ambientes controlados, utilizando água coletada em fontes com diferentes graus de trofia. Os resultados dos experimentos demonstram que em lagos eutrofizados e temperaturas entre 15, 25 e 35°C, as moléculas de eDNA se mantêm íntegras e detectáveis por até 3 dias, enquanto que a 5°C o tempo de persistência da molécula no ambiente é de 21 dias. Para avaliação da taxa de degradação de eDNA em diferentes estados tróficos de forma isolada, as amostras foram mantidas a temperatura constante de 15°C. Pode-se avaliar que em ambientes aquáticos oligotróficos amostras de eDNA foram detectáveis até 10 dias e até 28 dias em ambientes eutróficos e distróficos.

O pH é tido como importante fator em estudos relacionados degradação de matéria orgânica e manutenção de comunidades biológicas, sobretudo em ambientes aquáticos. O aumento da acidez em ambientes aquáticos ($\text{pH} < 5$) tem impacto negativo na taxa de degradação de matéria orgânica proveniente de macrófitas e diatomáceas, assim como na atividade de fungos e bactérias (CHAMIER, 1987) (SCHOENBERG *et al.*, 1990). Apesar de ser um fator determinante para taxas de degradação em ambientes naturais, isoladamente o pH não desempenha grande influência na taxa de degradação de eDNA. Em experimento controlado, Strickler; Fremier & Goldberg (2015) avaliaram a persistência de eDNA de girinos após sua retirada dos ambientes, tendo sido inoculadas três espécies de bactérias, mimetizando um ambiente natural. Notaram não haver diferença significativa quanto a taxa de degradação da molécula em pH 4 e 7, no entanto divergem quanto pH 10, em que o eDNA é degradado mais lentamente, o entanto, quando associado a outros fatores, eDNA expostos a pH 7 tiveram maior taxa de degradação quando comparados com pH 4 e 10. Os autores associam esse fato à condição favorável para o crescimento das bactérias utilizadas no experimento, que tendem aumentar a concentração de enzimas exonucleases. Os autores também avaliaram fatores de temperatura e incidência de luz (UV-B). Desses, apenas a temperatura atua de forma significativa para aceleração da degradação de eDNA no ambiente, sendo que quanto mais alta a temperatura, mais rápido a molécula é degradada. Quando combinados os três fatores (temperatura, pH e incidência de UV-B), ambientes quentes, expostos a luz solar e com pH

entre ácido e neutro tendem a apresentar alta taxa de degradação dessas moléculas. Além dos fatores bióticos e abióticos relacionados à degradação de eDNA no ambiente aquático, deve-se levar em consideração o tempo hábil para detecção de cada espécie, uma vez que a taxa de liberação de material genético no ambiente pode variar de acordo com a densidade populacional e fisiologia dos organismos, bem como sua biomassa (THOMSEN *et al.*, 2012) (BARNES *et al.*, 2014) (PILLIOD *et al.*, 2014).

Existem diferentes formas de se obter eDNA, podendo ser por extração direta do material bruto a ser analisado (água ou solo, por exemplo) ou feito por método de filtração, que tem por objetivo filtrar a água e reter moléculas de eDNA sorvidas no filtro ou moléculas de DNA, através de sorção (LIANG; KEELEY, 2013) (COBLE *et al.*, 2019). A recuperação de eDNA em ambientes aquáticos comumente é feita através da filtração, onde o material genético e possíveis células do organismo de interesse são retidos em filtros, que podem variar quanto tamanho, material e porosidade. Além da influência de fatores ambientais na persistência de moléculas de DNA no ambiente, o material do filtro utilizado no processo pode influenciar na recuperação de eDNA. Diferentes estudos demonstraram que filtros de Nitrato de Celulose (NC) e Mistura de Ésteres de Celulose (MCE) possuem alta performance na obtenção e retenção dessas moléculas (LIANG; KEELEY, 2013) (SPENS *et al.*, 2017).

Diferentes métodos de extração de filtrados de água tem sido empregado para obtenção de eDNA. Dentre eles, destacam-se o protocolo Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e uso de kits comerciais, como *MoBio PoweWater DNA extraction* (MoBio Laboratories Inc.) e *DNeasy Blood & Tissue®* (QIAGEN) (KUMAR; EBLE; GAITHER, 2019). O protocolo CTAB é uma formulação *in house* de baixo custo, no entanto requer o manuseio de agentes químicos perigosos, como clorofórmio e β - mercaptoetanol, e demandar maior tempo quando comparado com *kits* comerciais. A extração realizada por CTAB se baseia no uso de substâncias químicas para obtenção de material genético, variando sua formulação de acordo com o tipo de amostra, como tecidos animais, vegetais e fungos. Em suma, a execução do protocolo CTAB inicia com a ruptura de células ou tecidos, aos quais são adicionados 400 a 16000 μ L de *buffer* de extração contendo CTAB, Tris, NaCL, EDTA, e β -Mercaptoetanol. O conjunto contendo o material alvo de extração e *buffer* são aquecidos entre 55 - 70°C por 30 a 60 minutos, sendo homogeneizado em intervalos de tempo, sendo mais comum a cada 5 a 10 minutos. Posteriormente, é realizada separação física do material genético e outros componentes celulares. Para isso é adicionado o mesmo volume do *buffer* extração de uma solução contendo clorofórmio e álcool-icosamílico, na proporção de 24:1. Para melhor separação do material genético e outros componentes

celulares, a mistura é centrifugada, formando duas fases. A fase aquosa (sobrenadante) contendo DNA é então transferida para um novo tubo. Para etapa de limpeza, diferentes substâncias podem ser utilizadas, sendo mais comuns uso de *kits* comerciais ou álcool em diferentes concentrações. Feita adição da solução para limpeza, o conjunto é centrifugado para formação de *pellet* de DNA e o sobrenadante descartado. Comumente o *pellet* de DNA formado é eluído em 50-100µL de *buffer* TE (Tris-EDTA), aquecidos entre 50-65°C por 5 a 120 minutos. É indicado armazenamento da amostra de DNA em baixas temperaturas (SCHENK *et al.*, 2023).

Experimento realizado por Eichmiller; Miller e Sorensen (2016) investiga diferenças na concentração e número de cópias de DNA, quantificadas a partir de amostras de mesmo volume obtidas de lago e poço. A extração do material genético dessas amostras foi realizada utilizando seis *kits* comerciais diferentes. Foram identificadas variações significativas entre os *kits* de extração e a origem da água, pressupondo que a qualidade da água pode influenciar na eficiência da extração e amplificação por técnica de qPCR. Dentre os os três melhores resultados obtidos, o *kit DNeasy Blood & Tissue®* (QIAGEN) não apresenta diferença significativa quanto a sensibilidade de detecção de eDNA, porém sua eficiência na extração de amostras provenientes de lagos é menor quando comparada com *MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit* e *Qiagen QIAamp Stool Mini Kit* (EICHMILLER; MILLER; SORENSEN, 2016). Além do uso de kits de extrações comerciais, estudos pontam eficiência na dessorção de eDNA em filtros a partir do uso de protocolo CTAB (LIANG; KEELEY, 2013) (TURNER *et al.*, 2014), bem como na obtenção de gDNA em alta concentração e pureza (LIMA *et al.*, 2006). O uso de protocolo *in house*, como CTAB, depreende maior tempo de preparo e aplicação, no entanto se torna mais acessível devido ao baixo custo quando comparado com kits de extração comerciais (KUMAR; EBLE; GAITHER, 2019).

Compostos húmicos dissolvidos na água, produtos da decomposição de matéria orgânica, compostos fenólicos, gordura, ureia e metais pesados são algumas das substâncias que podem influenciar na reação de PCR, fazendo com que os produtos obtidos das extrações necessitem de diluição ou purificação para diminuir a concentração de inibidores na amostra (WILSON, 1997) (EICHMILLER; MILLER; SORENSEN, 2016).

Técnicas de análise a partir de amostras de eDNA têm sido utilizadas em diferentes frentes de estudo, como conservação, monitoramento de qualidade de água, paleontologia, ecologia de macro e microrganismos (FICETOLA *et al.*, 2008) (LIANG; KEELEY, 2013) (THOMSEN; WILLERSLEV, 2015) (ROBSON *et al.*, 2016) (EICHMILLER; MILLER; SORENSEN,

2016). O processamento de material genético do ambiente tem sido realizado por técnicas de biologia molecular baseadas na reação padrão de PCR, como qPCR (*quantitative PCR*), *nested PCR*, dentre outras, a depender dos objetivos. A técnica padrão de PCR consiste na geração exponencial de cópias de um alvo genético *in vitro*, através da utilização de um conjunto de componentes como sequência alvo, *primers* iniciadores, oligonucleotídeos, *buffer* contendo cofatores para formação de novas fitas de DNA, e enzima termoestável DNA-polimerase, os quais são submetidos a ciclos com diferentes temperaturas. Os ciclos da reação consistem em sucessivas fases de desnaturação da fita de DNA molde (>90°C), anelamento dos primers (50-75°C) e extensão de uma nova fita (72-78°C), aumentando exponencialmente o a quantidade de material genético alvo na solução (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Os *primer* iniciadores e a região a ser amplificada varia de acordo com o objetivo do pesquisador, sendo a região ITS (*internal transcribed spacer*) bastante explorada para estudos evolutivos e identificação de fungos e oomicetos, por ser uma região do genoma conservada, apresentar variabilidades interespecíficas e intraespecíficas que permitem desenho de *primers* específicos, e possuir múltiplas cópias ao longo do genoma (REIS *et al.*, 2023) (WHITE *et al.*, 1990). Além de sua variabilidade na região ITS, Kittichotirat (2023) relata diferenças quanto ao tamanho do genoma de cepas de *P. insidiosum*, que variam em tamanho de 34,541,218pb a 65,230,783 pares de base. Com isso, o conteúdo genético presente no genoma dessa espécie pode variar em até 23% entre diferentes cepas.

A técnica de qPCR apresenta vantagens quando comparada com técnicas de PCR *end-point* ou também conhecidas como convencionais, como maior sensibilidade de detecção, possibilidade de acompanhar a reação em tempo real e não necessitar de análises pós-teste, economizando tempo e recursos (SMITH; OSBORN, 2009). O acompanhamento da reação em tempo real é possível devido uso de agentes intercalantes que se ligam a DNA de fita dupla e geram sinais de fluorescência a cada ciclo, possibilitando acompanhar a replicação do material genético. A interpretação dos resultados da amplificação se baseia na valores de Cq ou Ct (ciclo de quantificação ou ciclo *threshold*), obtidos a partir da definição de um limiar de detecção de fluorescência (*threshold*). Em amostras clínicas, o limiar de detecção estabelecido pode influenciar em erros diagnósticos, através da interpretação de falso-positivos ou falso-negativos. A fim de evitar erros dessa natureza, é necessária uma configuração padronizada do limiar de detecção, com base na fase exponencial da reação e na curva de amplificação referente ao ensaio a ser realizado (VILLALBA; RUIJTER; HOFF, 2021). Apesar das facilidades conferidas pela técnica de qPCR, é preciso cuidado com delineamento experimental,

considerando os reagentes a serem utilizados, ciclo de reação e a matriz da amostra de interesse. Devido a possibilidade de erros analíticos, Liang & Keeley (2013) ressaltam a importância de avaliar os ensaios de qPCR aplicados a amostras de eDNA obtidas por filtração, através da caracterização dos limites de detecção e curvas de calibração. Amostras contendo material genético do alvo pretendido em baixas concentrações são sujeitas a erros de amostragem, tendo em vista a distribuição das moléculas de DNA na solução, que podem acarretar em erros de pipetagem durante o preparo das alíquotas (ELLISON *et al.*, 2006).

O material de eDNA obtido da extração de filtrados ou amostras ambientais, quando empregado em técnicas específicas, pode fornecer informações a respeito da riqueza e diversidade de organismos presentes no ambiente ou mesmo ser utilizado para identificação de organismos específicos que habitam determinado ambiente, possibilitando estudos de prevalência ou distribuição (GROOTERS; GEE, 2002). A técnica de *nested* PCR é amplamente empregada na identificação de organismos específicos provenientes de diversos tipos de amostras, como clínica e ambiental, e tem como objetivo melhorar a especificidade e eficiência de uma primeira reação PCR (JACKSON *et al.*, 2017). O procedimento consiste na amplificação de duas etapas, onde os produtos da primeira reação de PCR que tem alvo molecular sequências alvo maiores. A partir da obtenção de amplicons em uma reação de PCR primária, o produto obtido é utilizado como molde para uma segunda reação, desta vez com *primers* internos específicos do organismo de interesse (LIMA *et al.*, 2009). Para identificação de *P. insidiosum* por *nested* PCR, Grooters & Gee (2002) desenharam *primers* internos Pi-1 (5' -TTCGTCGAAGCGGACTGCT- 3') e Pi-2 (5' -GCCGTACAACCCGAGAGTCATA- 3'), que amplificam segmento de 105 pares de base, específicos para o organismo. Essa técnica vem sendo aplicada em diversos estudos para detecção molecular do patógeno, de forma a auxiliar no diagnóstico de pitiose, apresentando resultados promissores com alta sensibilidade e especificidade (NETO *et al.*, 2010) (WATANABE *et al.*, 2015) (PAZ *et al.*, 2022). A fim de detectar a presença de *P. insidiosum* no ambiente e buscar caracterizar seu nicho ecológico, Vanittanakom *et al.* (2014) utilizou técnica de *nested* PCR para identificação do patógeno em amostras de eDNA obtido do solo.

Objetivo

Identificar e monitorar a incidência de *P. insidiosum* junto às margens do Rio Tietê na região de Botucatu, onde foi possível a ocorrência de um surto de pitiose equina (Paz *et al.*, 2021).

Objetivos específicos

I) Comparar a eficácia técnicas de isolamento convencional e molecular na detecção do patógeno.

II) Caracterizar os ambientes quanto a incidência do patógeno por meio do levantamento de fatores ambientais possivelmente associados ao seu estabelecimento no ambiente, como temperatura, pH e pluviosidade.

Materiais e Métodos

Área de Estudo

A área de estudo foi delimitada de acordo com relatos de casos de pitiose, sendo a margem do rio Tietê na região de Botucatu/SP local de ocorrência de surto de pitiose equina (PAZ *et al.*, 2022). Baseado na literatura, foram escolhidos locais em potencial, considerando fatores como presença de vegetação ripária e/ou aquática e possível acesso de animais e humanos à área amostrada.

Ao total foram coletadas amostras em 20 pontos, distribuídos nas cidades de Botucatu/SP, Anhembi/SP, São Manuel/SP e Piracicaba/SP, que se encontram localizadas ao longo do rio Tietê e seus afluentes. Alguns pontos, sobretudo na cidade de Botucatu/SP foram amostrados mais de uma vez, em diferentes épocas do ano. As localizações foram registradas por coordenadas geográficas. As datas de coleta cobrem todas estações do ano, a fim de avaliar possível influência da temperatura da água e pluviosidade no estabelecimento de *P. insidiosum* no ambiente.

Dentre os locais amostrados, três estão localizados em área de propriedade particular, sendo dois pontos de São Manuel/SP e um de Anhembi/SP. A entrada nas propriedades foi autorizada pelos proprietários. As demais são áreas públicas. Os dados dos locais de coleta podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Dados referentes às datas, cidade e localização geográfica dos pontos amostrados neste trabalho.

	Pontos	Coordenadas	Cidade	Data
Coleta 1	A	-22.674100, -48.336867	Botucatu/SP	11/04/2022
	B	-22.675729, -48.347807		
Coleta 2	A	-22.674100, -48.336867	Botucatu/SP	20/05/2022
	B	-22.675729, -48.347807		
Coleta 3	A	-22.783960, -48.128281	Anhembi/SP	14/07/2022

	Pontos	Coordenadas	Cidade	Data
	B	-22.715351, -48.189522		
Coleta 4	A	-22.597877, -48.443239	São Manuel/SP	02/08/2022
	B	-22.648973, -48.446599		
Coleta 5	A	-22.681347, -48.327853	Botucatu/SP	15/12/2022
	B	-22.682733, -48.329505		
Coleta 6	A	-22.674722, -48.333833	Botucatu/SP	13/03/2023
	B	-22.674178, -48.332224		
Coleta 7	A	-22.677991, -48.244011	Anhembi/SP	17/03/2023
	B	-22.677076, -48.244403		
Coleta 8	A	-22.686053, -48.299175	Botucatu/SP	17/03/2023
Coleta 9	A	-22.597021, -48.438756	São Manuel/SP	20/03/2023
	B	-22.596467, -48.441718		
	C	-22.6453, -48.447944		
Coleta 10	A	-22.665582, -48.030909	Piracicaba/SP	24/03/2023
	B	-22.665592, -48.030898		

Análise de fatores ambientais

As medições dos parâmetros de temperatura e pH foram feitas *in situ* no momento da coleta, com auxílio de termômetro químico com coluna de mercúrio e fita indicadora de pH (Merck ©), com faixa entre 4 e 7. A medição se deu em alíquota de 500mL coletada em Becker de vidro. Para aferir a temperatura, o termômetro químico foi mantido submerso na água por cerca de um minuto, até estabilização da coluna de mercúrio. O mesmo se deu com a fita indicadora de pH, porém com tempo de dois a cinco minutos e ao abrigo de luz. Passado o tempo da fita submersa, a cor indicativa foi comparada com as referências colorimétricas estabelecidas pelo fabricante para determinação do valor.

O índice de precipitação pluviométrica, com intervalo de 15 dias anteriores à data de coleta, foi obtido em base de dados de estações meteorológicas mais próximas dos locais de coleta, administradas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) (Tabela 2).

Os registros referentes aos fatores temperatura, pH, vegetação, presença de fragmentos vegetais suspensos na água e identificação das plantas foram registradas em anotações de campo e fotografias. Para corroborar as identificações botânicas, foi feita consulta à base de dados Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>) e literatura especializada, como Lorenzi (2008), Pott *et al* (s.a.) e Pompêo (2017).

Tabela 2: Dados das estações meteorológicas consultadas para levantamento de pluviosidade.
Fonte: <https://mapas.inmet.gov.br/>

Cidade	Coordenada	Código da estação	Órgão responsável
Anhembi/SP	-22.77, -48.02	V0307	CIIAGRO
Barra Bonita/SP	-22.47, -48.56	A741	INMET
Botucatu/SP	-22.85, -48.43	V0330	CIIAGRO
Santa Maria da Serra/SP	-22.57, -48.16	V0481	CIIAGRO

Isolamento convencional

As amostras foram coletadas em coluna d'água com ± 10 cm de profundidade e acondicionadas em frascos âmbar, previamente esterilizados e com capacidade de 250 mL. Cada ponto de coleta foi amostrado em duplicata, tanto para isolamento convencional quanto para filtragem da água para posterior extração de eDNA do filtrado. Para isolamento convencional, em cada frasco foi adicionado um fragmento de ecdise de serpente como isca, com cerca 3-5 cm de comprimento e previamente autoclavados, para possível colonização do substrato queratinizado pelo organismo. Após a adição das iscas, os frascos foram acondicionados em estufas, ao abrigo de luz, em temperatura de 35°C, durante 24h. Passado o tempo de incubação, a água foi drenada e armazenada em recipiente de metal, o qual foi autoclavado e descartado. As iscas foram coletadas assepticamente, com o auxílio de uma pinça estéril, e depositadas em placas contendo meio MiPi, Meio de Isolamento para *P. insidiosum*, adaptado de SUPABANDHU *et al.* (2008) e incubada por até 15 dias, a 25°C. O meio MiPi é composto por Sabouraud dextrose 2%, acrescido de antibióticos cloranfenicol e gentamicina [50µg/mL], bem como de antifúngicos, como anfotericina B de mesma concentração e Derosal [500mg/mL]. As placas contendo as iscas foram observadas diariamente e individualmente, por um período de até quinze dias, utilizado o microscópio estereoscópio com aumento de 40x, a fim de detectar possível colonização do organismo. As colônias com aspecto filamentosas de coloração bege/esbranquiçada sugestivas para *Pythium insidiosum* e/ou *Pythium* spp., foram isoladas em agar Sabouraud dextrose 4% e submetidas às análises morfológicas e moleculares para identificação.

Identificação morfológica e molecular dos isolados

Para identificação morfológica dos isolados suspeitos de *Pythium* sp., primeiramente foram avaliados aspectos macroscópicos da colônia, como coloração hialina ao branco, micélio aéreo curto ou ausente e crescimento radial com bordas irregulares. Passado pelo primeiro critério, foi utilizado método de micro cultivo para avaliar aspectos morfológicos a nível microscópico das colônias suspeitas. Adaptada de Ridell (1950), a técnica de micro cultivo consiste em uma placa de Petri de vidro, contendo dois pedaços de palito de madeira com cerca de 5 cm cada, sob os quais são depositadas uma lâmina de vidro e lamínula. O sistema é esterilizado em autoclave e após isso, a lamínula é cuidadosamente retirada de cima da lâmina e um pequeno bloco de meio de cultura SAB 4% com cerca de 1x1 cm de tamanho e 0,2 a 0,5 cm de altura é colocado sob a superfície da lâmina. O bloco de meio de cultura é então inoculado em suas arestas com o organismo de interesse e a lamínula posta em cima do bloco de meio de cultura. Um pedaço de algodão umedecido com água destilada estéril é colocado junto ao sistema, a fim de formar uma câmara úmida. A placa de Petri, agora vedada, é acondicionada a temperatura de 25°C até o crescimento do organismo de interesse. Após cerca de sete dias, as lâminas e lamínulas foram identificadas, coradas com lactofenol azul-algodão e observadas em Stereo microscópio Discovery V20 (Zeiss).

Para caracterização microscópica das culturas, foram avaliados aspectos como ângulo de inserção das hifas (<90°C), formato da hifa, sua característica cenocítica e ausência de estruturas reprodutivas. Todas as culturas sob suspeita de *Pythium* sp., independente da presença ou não de contaminantes, tiveram gDNA extraído. Para extração de gDNA foi aplicado protocolo CTAB adaptado, onde fragmentos da borda das colônias foram coletados com alça microbiológica esterilizada e transferidos para um cadinho estéril, onde procedeu congelamento com nitrogênio líquido e maceração com auxílio de pistilo, também estéril. O micélio macerado foi transferido para microtubo de 2 mL contendo *glass beads* (425–600 *microns*, *acid washed*, Sigma-Aldrich) e 490 µL de buffer de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 30 mM EDTA; 2% CTAB; 2% mercaptoetanol) e 10 µL proteinase K [10mg/mL]. O conteúdo foi agitado em *Precellys 24 Tissue Homogenizer* (Bertin Instruments). Após agitação foi adicionado 500 µL de clorofórmio:álcool icosamilico (24:1), homogeneizado por 2 minutos, incubado em banho maria a 60°C por uma hora. Após a incubação, foi feita centrifugação do material a 14000g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo. A cada volume de até 400 µL de amostra, foi adicionado 270 µL de álcool isopropílico. Após homogeneização, o conteúdo foi centrifugado a 14000g por 10 minutos. O

sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado lavado com 100 µL de álcool 70%. O álcool proveniente da lavagem foi dispensado e o tubo mantido aberto até secagem do *pellet*. O conteúdo foi ressuspensionado em 50 µL de buffer estoque (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

A fim de obter eDNA do ambiente, em cada ponto foi coletado cerca de 200 mL de água em duplicata, utilizando frascos de vidro estéreis. O transporte dos frascos de vidro contendo amostras de água foi feito em caixas térmicas contendo gelo para manutenção do material genético presente na amostra (WILLIAMS; HUYVAERT; PIAGGIO, 2016) (DEINER *et al.*, 2015). Foram realizados diferentes ciclos de filtração para evitar contaminação cruzada entre as amostras. Cada ciclo de filtração foi realizado com dois frascos provenientes do mesmo ponto amostrado (2x 250 mL), os quais foram retirados do gelo cerca de 5 minutos antes do processo para decantação de materiais particulados. A água coletada foi filtrada em filtro NC MF-Millipore™ com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm, disposto em funil de Büchner e com auxílio de bomba a vácuo 60 LPM (Quimis Aparelhos Científicos Ltda.) conectada a um Kitassato. Os filtros foram transferidos assepticamente para placa de Petri esteril e cortados em pedaços de cerca de 0,5 a 1 cm, com auxílio de lâmina para bisturi esteril e transferidos para microtubo de 2 mL. Para extração de eDNA retido no filtro foi utilizado método CTAB (descrito acima) com modificações. Não foi realizada quebra mecânica do filtro por maceração ou *glass beads*, passando à adição de 490 µL de buffer de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 30 mM EDTA; 2% CTAB; 2% mercaptoetanol) e 10 µL proteinase K [10mg/mL] ao microtubo e agitação em Precellys. A solução foi transferida para novo microtubo para execução das próximas etapas do protocolo conforme descrito acima.

A escolha do material do filtro se deve à boa eficiência de NC em reter material genético e assim prover alto número de cópias de DNA após processamento por técnicas de PCR (RENSHAW *et al.*, 2015) (LIANG; KEELEY, 2013), enquanto que a porosidade condiz com tamanho inferior ao diâmetro dos zoósporos de *Pythium* sp. (entre 6 e 14 µm), observado por Chaiprasert *et al.* (1990). Todo material de DNA extraído (gDNA e eDNA) foi quantificado em aparelho *nanodrop* 2000c (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 260 nm.

Como forma de controle, a fim de identificar a possível presença de inibidores de PCR nas amostras de eDNA e avaliar a eficiência da extração do protocolo aplicado, foram realizadas reações de cPCR utilizando *primers* 16S (1500pb), universais para bactérias. Para reação foi utilizado Go-Taq® Green Master Mix [1X] (Promega, Madison, WI, EUA), com volume final de 25 µL, jogo de *primers* 16S rDNA *forward* (5' – AGAGTTTGATCATGGCTCAG – 3') e *reverse* (5' – CGGTTACCTTGTTACGACTT – 3'), com concentração final de 560nM e

programação de parâmetros de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 96 °C por 60 segundos, anelamento a 50 °C por 60 segundos, polimerização inicial 72 °C por 60 segundos e polimerização final a 72 °C por 5 minutos. O resultado da reação foi observado em eletroforese de gel de agarose 1,5%.

Técnicas cPCR, nPCR e qPCR

Para avaliar os parâmetros e especificidade do *foward primer* Pi-1 (5' - TTCGTCTGAAGCGGACTGCT- 3') e *reverse primer* Pi-2 (5' - GCCGTACAACCCGAGAGTCATA- 3') (GROOTERS; GEE, 2002) utilizados nas reações de PCR, foi utilizada a ferramenta *Primer BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e base de dados *Nucleotide Collection – nr* (coleção de nucleotídeos) do NCBI.

As sequências também foram analisadas cruzando-as com a base de dados da coleção de nucleotídeos de microrganismos pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Eukarya*, sendo que neste último foram selecionados os grupos Oomycota e Fungi.

A fim de identificar a presença de material genético de *P. insidiosum* nas amostras de eDNA extraídas dos filtros, foram utilizadas as técnicas de cPCR, *nested* PCR e qPCR. Essas mesmas técnicas foram utilizadas para identificação do patógeno a partir de gDNA extraído de cepas isoladas por método convencional, sob suspeita de ser o patógeno de interesse. Amostras de gDNA provenientes de colônias puras foram submetidos a reação de cPCR utilizando primers ITS 4 e 5 e os *amplicons* da reação foram purificados com Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e enviados para sequenciamento por método Sanger no Instituto de Biotecnologia (IBTEC), da UNESP de Botucatu. O resultado do sequenciamento foi analisado no software MEGA 11.

As amostras de gDNA e eDNA foram submetidas a técnicas de cPCR, nPCR e qPCR, ambas tendo *primers* específicos para *Pythium insidiosum*.

Para nPCR, na primeira reação foi utilizado jogo de *primers* universais de fungos ITS 4 *foward primer* (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') e ITS 5 *reverse primer* (5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG- 3'), concentração final de 560 nM, com parâmetros de desnaturação inicial de 95 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 40 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, polimerização inicial 72 °C por 50 segundos e polimerização final a 72 °C por 5 minutos (WHITE *et al.*, 1990). Na segunda reação foram utilizados *primers* específicos Pi-1 e Pi-2, amplificando segmento de 105 pares de base. Os parâmetros estabelecidos para desnaturação inicial da segunda reação foi de 94°C por 3 minutos, seguido de 28 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C

por 30 segundos, polimerização inicial a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Ambas reações foram realizadas em termociclador *Veriti Thermocycler* (Applied Biosystems, Foster, EUA), utilizando Go-Taq® Green Master Mix [1X] (Promega, Madison, WI, EUA), volume final de 25 µL e concentração final de *primers* a 560 nM.

A técnica de cPCR utilizando jogo de *primers* Pi-1 e Pi-2 seguiu as mesmas concentrações de reagentes e de parâmetros da segunda reação da nPCR, porém com 35 ciclos.

Os materiais amplificados em ambas reações (cPCR e nPCR) foram revelados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em que foram adicionadas alíquotas de 5 µL de amostra nos poços e marcador com peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Carlsband, CA, EUA). A eletroforese foi feita em cuba horizontal contendo solução tampão TBE 0,5X, com ciclos de 80V por 15 minutos e 120V por 18 minutos. O gel foi visualizado e registrado por fotodocumentador de luz ultravioleta (VisionWorks ® LS Analysis Software, Analytik, Jena, Alemanha).

A reação de qPCR foi aplicada utilizando-se 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix SYBR® Green [2X] (Promega), 1,2µL de cada *primer* [660 nM], 4,6µL de água *nuclease free* (NFW) e 3µL de amostra de DNA (~ 50ng/µL), em instrumento AriaMx Real-Time PCR (qPCR) Instrument (Agilent), e análises pelo software Agilent Aria Mx (2014-2022). Os parâmetros de reação foram determinados seguindo desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos. Para avaliar a eficiência da reação, foi realizada reação de qPCR utilizando-se jogos de *primers* específicos para o patógeno de interesse (Pi-1 e Pi-2) e uma amostra controle de *P. insidiosum* e concentração conhecida (50 ng/µL). A reação para avaliar a eficiência da reação se deu em diluições seriadas da amostra, em duplicata, na proporção de 1:10, até diluição de 10⁻⁶, em TE (Tris 10mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0).

Sequenciamento das amostras

Os amplicons foram sequenciados pela metodologia de Sanger, utilizando o *kit* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) de acordo com seguintes volumes: 0,5 uL de BigDye™ Ready Reaction, 1,75 µL solução tampão (5X), 4,75 µL de NFW e 3 µL de mistura contendo DNA e *primer* alvo. A seguir, a solução foi submetida a 40 ciclos de 96°C por 2 minutos, 96°C por 15 segundos, seguidos de resfriamento a 1°C por segundo até temperatura de 50°C, em que permaneceu por 15 segundos, e em seguida 60°C por 4 minutos. A reação foi realizada em termociclador *Veriti Thermocycler* (Applied Biosystems, Foster, EUA).

A cada amostra, foi realizada precipitação do produto da reação utilizando as seguintes soluções e volumes: etanol (50 µL), EDTA [125 mM] (2 µL) e acetato de sódio (2 µL). Após 15 minutos em temperatura ambiente, as amostras, contendo material genético e solução de precipitação, foram centrifugadas por 30 minutos a 3000g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado. A seguir, em cada amostra foi adicionado 70 µL de etanol 70% e centrifugada a 2000g por 15 minutos. Para secagem e eliminação de resíduos de etanol, as amostras foram acondicionadas abertas em termociclador a 94°C por 4 minutos. Posteriormente foi adicionado 10 µL de formamida Hi-Di às amostras e vedadas, para a seguir passar por processo de desnaturação a 95°C por 3 minutos e centrifugação. Feito isso, as amostras foram processadas em sequenciador capilar automático ABI3500 (Applied Biosystems) e os eletroferogramas foram analisados no programa MEGA 11. Os resultados foram comparados com banco de dados *Genbank* através da ferramenta *BLASTn*.

Análises estatísticas

Para escolha do teste estatístico adequado, foi montado dois grupos independentes para cada uma das variáveis ambientais de interesse (pH, temperatura da água e pluviosidade). Esses grupos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para análise exploratória dos dados, com significância estatística ao nível de 5% (0,05). As prerrogativas das análises se basearam na hipótese nula de que a média dos grupos testados não apresentam diferenças e hipótese alternativa de que a média dos grupos são diferentes quanto a variável avaliada.

As variáveis com distribuição paramétrica dos dados foram submetidas ao Teste t bicaudal, a fim de comparar as médias dos dois grupos. No caso de distribuição não paramétrica foi realizado teste de Mann- Mann-Whitney. Em ambos foi adotado nível de significância (P) de 0,05 (5%).

Todos os testes estatísticos foram feitos usando GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

Caracterização ambiental

Dados qualitativos do ambiente foram registrados como observações, no intuito de auxiliar na caracterização da água no momento da coleta. Dentre as observações registradas, foram identificados fatores em comum a todos pontos de coleta, como água estagnada, plantas aquáticas de diferentes espécies e densidades populacionais, vegetação ripária às margens,

fragmentos de origem vegetal em suspensão, e em alguns pontos presença de fitoplâncton e diferentes espécies de animais, como peixes e outros invertebrados.

A turbidez da água nos locais amostrados não foi mensurada quantitativamente, no entanto, a partir de observações de campo, pode-se constatar heterogeneidade quanto à cor aparente da água. Ambientes com maior densidade de vegetação e acúmulo de matéria orgânica em suspensão, aparentemente apresentaram maior turbidez (Figura 2).



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.

Dentre as plantas observadas e identificadas nos pontos amostrados, foi registrada maior ocorrência de *Eichhornia crassipes* (65%), seguida de representantes da família Poaceae (65%), *Pistia stratiotes*. (30%) e *Salvinia* spp. (15%). Dessas plantas, *E. crassipes*, *Salvinia* sp. e *P. stratiotes* são classificadas como macrófitas aquáticas livre flutuantes, enquanto representantes da família Poaceae identificadas como *Polygonum* sp. e *Brachiaria* sp., são classificadas como plantas anfíbias, por serem enraizadas no substrato e ter a capacidade de habitar na interface

água-terra. Todos ambientes amostrados podem ser classificados como lênticos, devido baixa movimentação de água e o represamento da mesma, que favorece o aparecimento de grandes populações de macrófitas aquáticas (CASALE DALLA VILLA; SAMPAIO, 2016).

Quanto aos fatores abióticos, foram aferidos parâmetros de temperatura e pH (Tabela 3). Com exceção dos pontos amostrados na décima coleta (10A e 10B), foram registradas temperaturas mais baixas no ambiente aquático quando comparado com temperatura atmosférica no momento da coleta. A amplitude térmica entre o ambiente aquático e atmosférico ficou entre 0,2°C e 12,4°C, observados em amostragens feitas no verão e inverno, nos pontos 9A e 2B, respectivamente.

Quanto ao pH da água, foram registrados valores entre 5 e 6,8. Segundo Fernandes *et al* (2005), ambientes com pH entre 5 e 6,5 podem ser caracterizados levemente ácido enquanto valores entre 6,6 e 7,5 os caracterizam como neutros.

Devido ao fato de cada estação meteorológica registrar os dados em frequências diferentes ao longo do dia, foi calculada a média das temperaturas máxima e mínima registradas em cada um dos 15 dias que antecederam a coleta. Para os dados pluviométricos, foi feita somatória dos registros nesse mesmo intervalo de tempo.

Tabela 3: Dados ambientais mensurados em cada um dos pontos amostrados.

Pontos Amostrados	pH	Pluviosidade (mm)	Temp. Ambiente (°C)	Temp. Água (°C)	Vegetação
1 ^a	5.5	15	25.5	27	<i>Eichhornia crassipes</i> ; <i>Brachiaria</i> sp.
1B	5.8	15	25.5	28	<i>Eichhornia crassipes</i> ; <i>Polygonon</i> sp., <i>Brachiaria</i> sp.
2 ^a	5.3	14.1	9.6	21	<i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Brachiaria</i> sp.
2B	5.5	14.1	9.6	22	<i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i>
3 ^a	5.8	0.1	23.2	25	<i>Pistia stratiotes</i>
3B	5.5	0.1	25.6	26	<i>Eichhornia crassipes</i> ., Poaceaes
4 ^a	6.1	0	17.2	24.5	<i>Salvinia</i> sp., Poaceaes
4B	5.5	0	21	25	<i>Eichhornia crassipes</i> , Poaceaes
5 ^a	6.8	46	26	28	<i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Brachiaria</i> sp.
5B	5.5	46	25	30.7	<i>Eichhornia crassipes</i> ., Poaceaes
6 ^a	6.1	131	26	28	<i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i> ., <i>Brachiaria</i> sp.
6B	5.8	131	26	28.3	<i>Eichhornia crassipes</i>
7 ^a	5	171.5	26	26.5	<i>Eichhornia crassipes</i>
7B	5	171.5	26	26	-
8 ^a	6	36.9	29	29.5	<i>Eichhornia</i> sp.; <i>Pistia stratiotes</i>
9 ^a	6	105.6	28.5	28.7	<i>Eichhornia crassipes</i> , Poaceaes
9B	6	105.6	28.5	29.5	-

Pontos Amostrados	pH	Pluviosidade (mm)	Temp. Ambiente (°C)	Temp. Água (°C)	Vegetação
9C	6	105.6	29.5	32	<i>Salvinia</i> sp., Poaceaes
10A	5.5	111	30	28	<i>Salvinia</i> sp., <i>Pistia stratiotes</i> , Poaceaes
10B	5.5	111	31	28.5	<i>Pistia stratiotes</i> , Poaceaes

Controle da extração de eDNA

A fim de avaliar a eficácia do método empregado para extração de eDNA, foi realizada reação de cPCR utilizando *primers* universais de Bactérias 16S (1500pb), como forma de controle para análises subsequentes. O resultado da reação mostra que, do total de 40 amostras, 29 (72,5%) não apresentaram fatores inibidores em concentração suficiente a ponto de inviabilizar a reação de PCR. As amostras não amplificadas na reação são referentes a pontos das coletas 3, 4, 5 e 9, sendo que apenas na localidade da coleta 5 nenhum dos pontos foram amplificados (Figura 3).

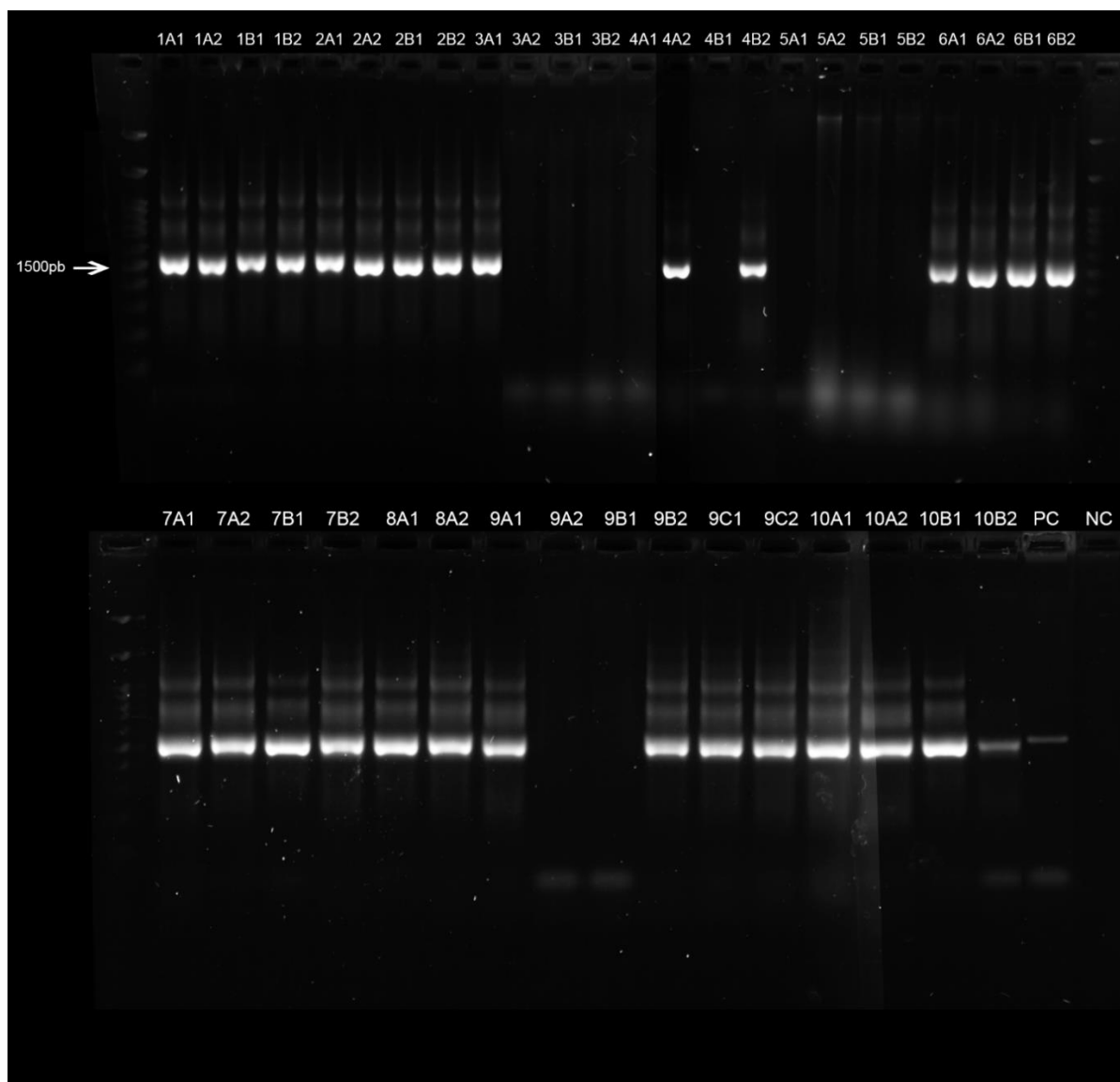


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose da reação de cPCR das amostras de eDNA extraídas, tendo como alvo *primers* da região 16S universais para bactérias, com *amplicons* de 1500pb. (PC): Controle positivo. (NC): Controle negativo. Marcador molecular de 1kb.

Teste dos *primers* Pi-1 e Pi-2 e eficiência da reação de qPCR

Como resultado da caracterização dos *primers*, as sequências *foward* (Pi-1) e *reverse* (Pi-2) demonstraram aplicabilidade em todas técnicas moleculares propostas neste trabalho, com tamanhos de 19 e 22 pb, T_m de 61,92 e 61,84, porcentagem de Guanina e Citosina (GC%) de 57,89 e 54,55, respectivamente.

A avaliação do pareamento dos *primers* com sequências genéticas de representantes do grupo Oomycetes disponíveis na base de dados (NCBI) demonstrou identificação com *Pythium insidiosum*, *Aphanomyces astaci*, *Saprolegnia diclina*, *Aphanomyces invadans*, *Phytophthora agathidicida*, *Phytophthora sojae* e *Pythium* sp. Apesar do pareamento com diferentes

organismos, apenas *Pythium insidiosum* e *Pythium* sp. tiveram produtos com fragmento de ~100pb.

O gráfico da curva de amplificação da qPCR, proveniente da reação de eficiência realizada com diluições seriadas da amostra controle, pode ser observado na Figura 4. A curva de amplificação retornou valores de eficiência de 83,72%, coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,99; *slope* de -3,79 e temperatura de *melting* (T_m) entre 83,5 e 84 °C.

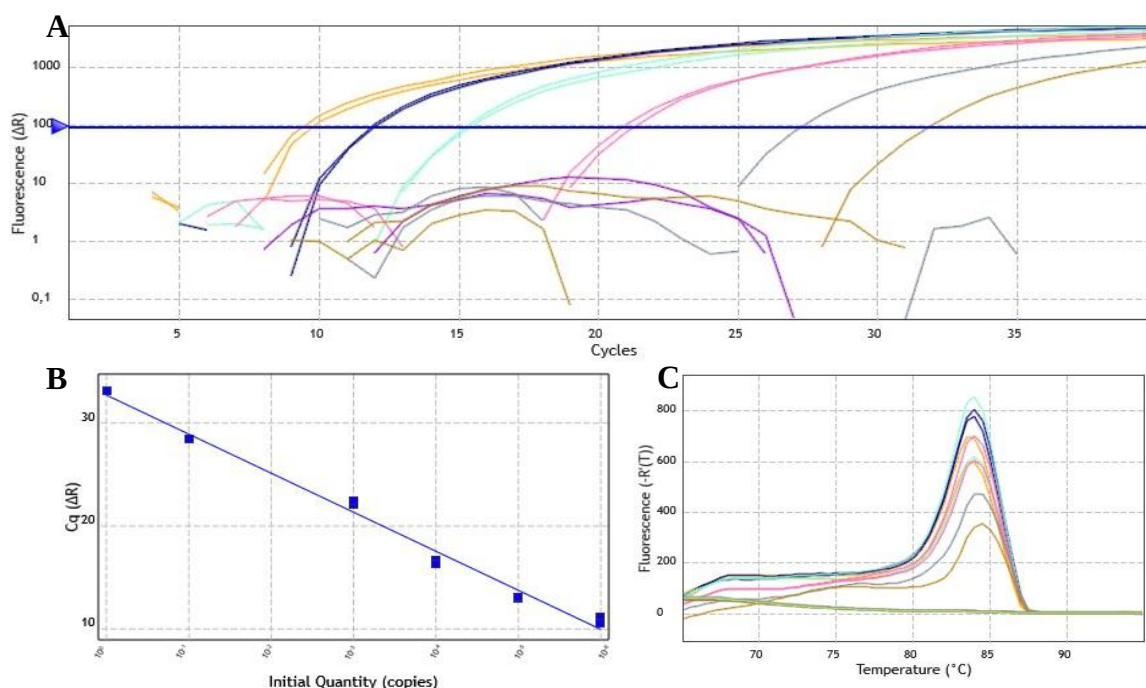


Figura 4: Resultado da reação para geração da curva de eficiência da técnica de qPCR utilizando amostra controle de *Pythium insidiosum* e primers Pi-1 e Pi-2. (A) Curva de amplificação da reação até diluição de 10⁻⁶, em ordem decrescente. (B) Gráfico da curva de eficiência da reação, com 6 pontos. (C) Gráfico da curva de dissociação obtida na reação.

Isolamento convencional: identificação morfológica e molecular

A fim de selecionar culturas isoladas suspeitas de *Pythium* sp. para identificação morfológica e molecular, foi observado aspectos macroscópicos da colônia. Colônias com crescimento radial, bordas irregulares, formação de membrana, coloração hialina ao branco, hifas calibrosas e micélio aéreo curto ou ausente, foram submetidas à análise morfológica por microscopia, a fim de selecionar colônias sob forte suspeita de se tratar de *Pythium* sp. A partir do micro cultivo, foram observados aspectos morfológicos das hifas, como ângulo agudo (< 90°), característica cenocítica e ausência de estruturas reprodutivas, para futuro processamento molecular de identificação genética.

Utilizando a técnica de isolamento convencional, ao todo foram obtidas 14 culturas para análises morfológicas por micro cultivo, sob suspeita de se tratar do organismo de interesse. No entanto, a viabilidade de parte das culturas para aplicação da técnica foi afetada pela alta taxa de contaminação bacteriana, bem como crescimento simultâneo de outros organismos filamentosos, que possivelmente inibiram o crescimento do organismo de interesse, mesmo utilizando meio de cultura seletivo (MIPi). Dentre as culturas isoladas e que foi possível aplicação da técnica de micro cultivo, apenas quatro contemplaram os critérios morfológicos e se enquadraram como suspeitas de *Pythium* sp., uma vez que a identificação taxonômica por morfologia das hifas é imprecisa. As culturas suspeitas e que puderam ser caracterizadas morfolologicamente são provenientes da primeira (dois isolados), segunda (um isolado) e nona coleta (um isolado) (Figura 5). Outras duas culturas com aspecto macroscópico condizente com *Pythium* sp. foram assumidas como forte suspeita e incluídas no processamento molecular para identificação.

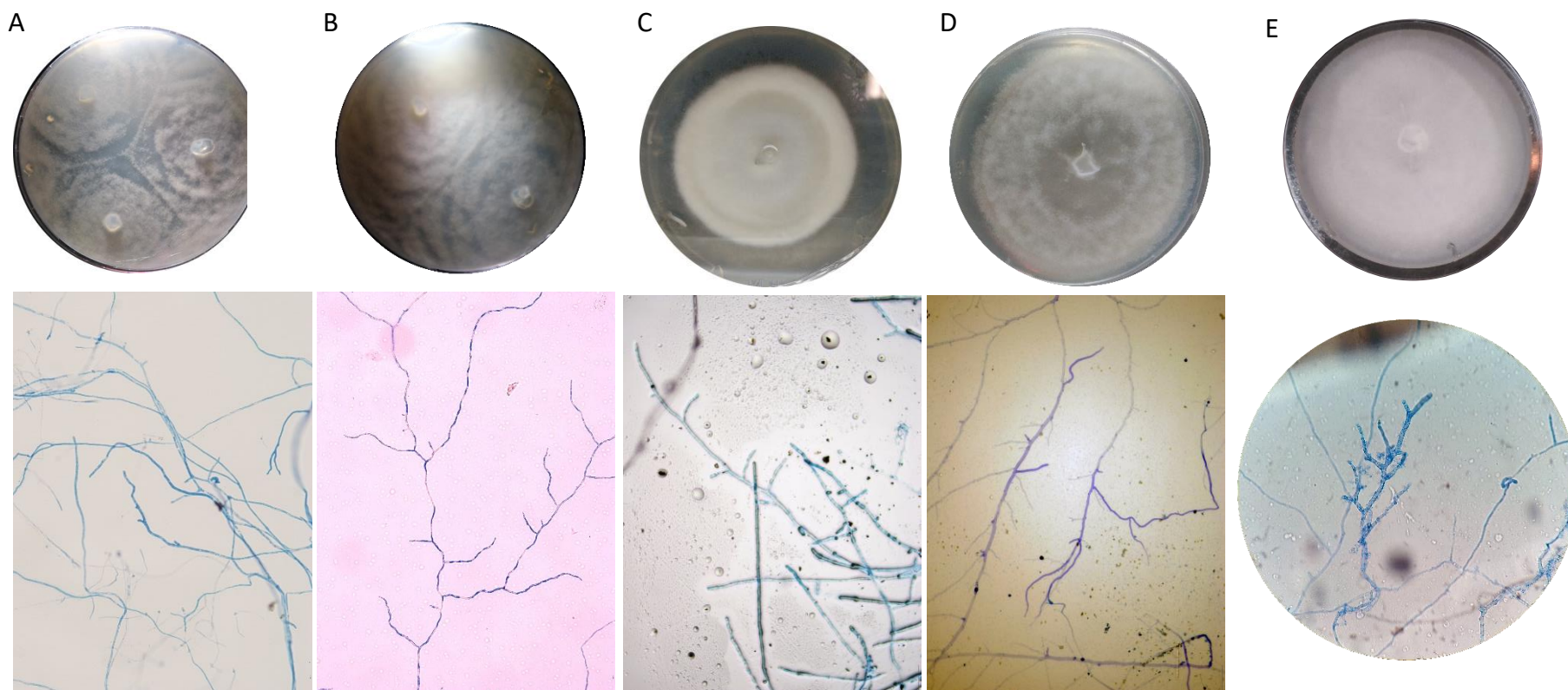


Figura 5: Colônias isoladas sob suspeitas de *Pythium* sp. (A e B) *Pythium longipapillum*, provenientes dos pontos 1A e 1B, respectivamente. (C) sem identificação, proveniente do ponto 2A. (D) *Pythium* sp., isolado no ponto 9B. (E) *Pythium insidiosum*, ponto 2A.

Feita a triagem dos isolados por aspectos morfológicos, as culturas foram imediatamente submetidas à técnica de extração de gDNA e posteriormente cPCR, utilizando-se como alvo *primers* universais para fungos (ITS 4 e ITS 5) (Tabela 4). Os *amplicons* obtidos na reação de cPCR foram purificados e enviados ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC), da UNESP, Campus de Botucatu, para sequenciamento por método Sanger.

Através do sequenciamento genético foram identificados seis isolados representantes do gênero *Pythium*, sendo dois isolados da espécie *Pythium longipapillum* (33,3%), dois isolados da espécie *Pythium catenulatum* (33,3%) e dois isolados identificados a nível de gênero como sendo *Pythium sp.* (33,3%) (Tabela 4).

Tabela 4: Identificação molecular utilizando *primers* ITS 4 e 5 de culturas puras e colônias suspeitas de *Pythium sp.*

Ponto	ID Cultura	Identificação	GenBank	Query cover	ID (%)
1 ^a	C1	<i>Pythium longipapillum</i>	MW412833.1	100	100
1B	C2	<i>Pythium longipapillum</i>	MW412835.1	100	99
4 ^a	C8	<i>Pythium catenulatum</i>	MK910125.1	96	98,18
4 ^a	C9	<i>Pythium catenulatum</i>	LC150553.1	99	99
9B	C13	<i>Pythium spp</i>	MK072650.1	100	99,29
10 ^a	C14	<i>Pythium spp</i>	KT247392.1	99	99,66

Mesmo contaminadas com outros organismos, as culturas que não puderam ser submetidas à técnica de micro cultivo ou diferenciação macroscópica tiveram seu gDNA extraído, a fim de utilizar técnicas moleculares de cPCR, nPCR e qPCR com *primers* específicos (Pi-1 e Pi-2) para possível identificação do patógeno. O resultado da cPCR e revelado por eletroforese, indica presença de bandas de *amplicons* com cerca de 100 pb, sendo a maioria de baixa intensidade, com exceção da amostra C5, que apresentou uma banda de alta intensidade, que pode indicar maior concentração de DNA alvo na amostra (Figura 6).

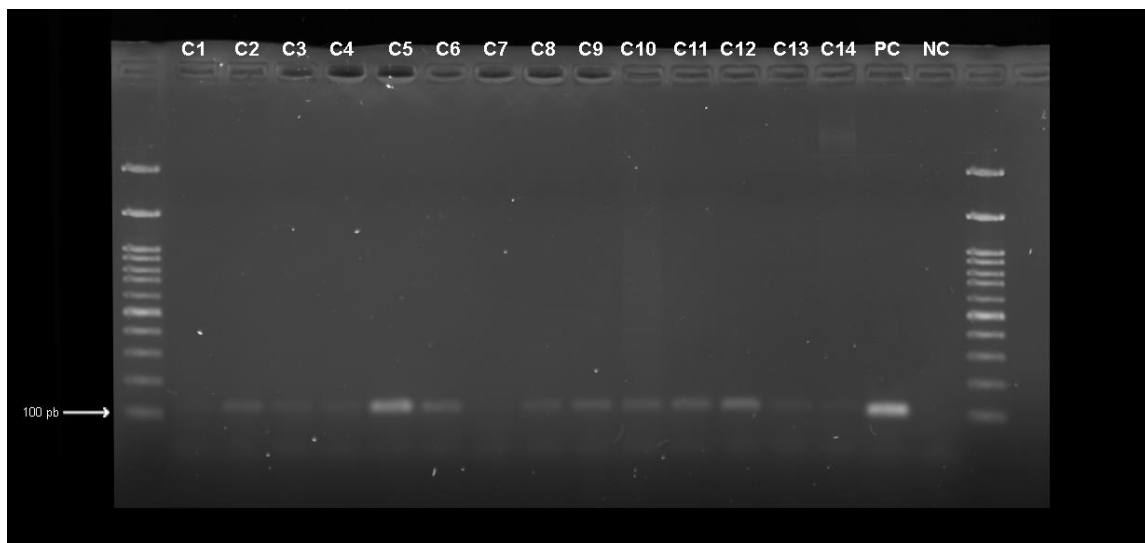


Figura 6: *Amplicons* revelados por eletroforese em gel de agarose, provenientes da reação de cPCR com *primers* Pi-1 e Pi-2 (~105 pb). (C1 a C14) Amostras de gDNA proveniente de culturas isoladas por método convencional. (PC) controle positivo; (NC) controle negativo.

Os produtos da primeira reação de nPCR, utilizando-se *primers* universais para fungos (ITS 4 e 5), revelados por eletroforese em gel de agarose, revelam bandas de diferentes pesos moleculares em diversas amostras, indicando presença de mais de um organismo nas culturas das quais foi extraído gDNA (Apêndice 3). A amostra extraída da cultura C5 não foi amplificada na primeira reação da nPCR, no entanto foi observada banda de baixa intensidade após segunda reação com *primers* específicos (Figura 7)(Apêndice 3). O produto dessa amostra, gerado na segunda reação, foi purificado e foi enviado para sequenciamento genético no Instituto de Biotecnologia (IBTEC)/UNESP de Botucatu. O resultado foi processado no *Software* MEGA 11 e comparado com banco de dados *Genbank* através da ferramenta *BLASTn*, confirmando a identificação de *P. insidiosum*, com 98,8% de identidade e 83% de cobertura das 63 pb analisadas (código de acesso AY598637).

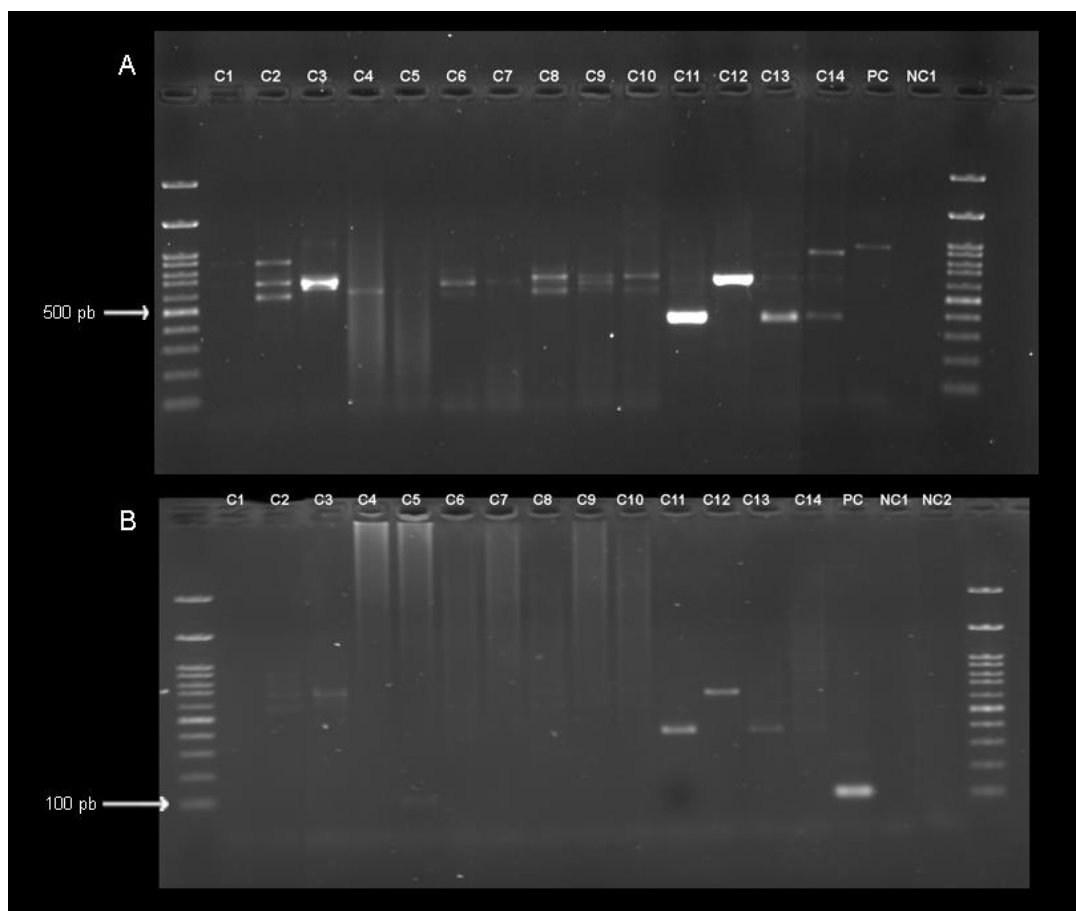


Figura 7: *Amplicons* revelados por eletroforese em gel de agarose, provenientes da reação de nPCR. (A) *Amplicons* obtidos na primeira reação, com *primers* ITS 4 e 5. (B) *Amplicons* da segunda reação, com *primers* Pi-1 e Pi-2. (C1 a C14) Amostras de gDNA proveniente de culturas isoladas por método convencional. (PC) controle positivo; (NC) controle negativo

Uma amostra sabidamente positiva e identificada como *P. insidiosum* foi analisada por qPCR e com os parâmetros observados em sua amplificação, foi estabelecido critérios de positividade com T_m de $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, C_t igual ou menor que 25 e considerando um limiar de detecção de fluorescência (*threshold*) de 100. O estabelecimento de um ponto de corte baixo ($C_t = 25$) foi fundamentado na curva de eficiência obtida previamente, sendo considerado que diferentes cepas de *P. insidiosum* apresentam variações no tamanho do genoma e a região avaliada (ITS) está presente em várias cópias ao longo do genoma (Kittichotirat *et al.*, 2023) (Krajaejun *et al.*, 2018). Esses fatores podem influenciar na taxa de detecção e no esgotamento de reagentes necessários para amplificação dos fragmentos de interesse por PCR.

Com isso, consideramos detecção de *P. insidiosum* em apenas uma das amostras (C5), corroborada pelo resultado das outras técnicas empregadas.

Considerando como critério de positividade a detecção do patógeno em duas ou mais técnicas de PCR, tem-se que apenas uma amostra cultivada continha colônia de *Pythium*

insidiosum, sendo representante do primeiro ponto amostrado na segunda coleta (2A), realizada na cidade de Botucatu/SP (Tabela 5).

Tabela 5: Análise molecular de isolados, tendo *primers* Pi-1 e Pi-2 como alvos.

Ponto	ID amostra	cPCR	nPCR	qPCR	T _m (°C)	Ct	Deteção
1 ^a	C1	0	0	0	84,5	31,07	Negativa
1B	C2	1	0	0	84,5	27,8	Negativa
2 ^a	C3	1	0	0	84,5	30,01	Negativa
2 ^a	C4	1	0	0	84,5	28,98	Negativa
2 ^a	C5	1	1	1	84,5	17,98	Positiva
2B	C6	1	0	0	84,5	26,31	Negativa
2B	C7	0	0	0	85	32,81	Negativa
4 ^a	C8	1	0	0	84,5	29,12	Negativa
4 ^a	C9	1	0	0	84,5	28,01	Negativa
4B	C10	1	0	0	84,5	28,66	Negativa
7 ^a	C11	1	0	0	84	26,34	Negativa
7B	C12	1	0	0	84	25,33	Negativa
9B	C13	0	0	0	84,5	30,2	Negativa
10 ^a	C14	0	0	0	84	36,65	Negativa

Deteção Molecular de *P. insidiosum* a Partir de eDNA

As amostras de eDNA provenientes da extração dos filtrados de água foram quantificadas avaliadas em relação a pureza da amostra (apêndice 1). Em relação a quantificação, observa-se variações na concentração de DNA nos diferentes pontos amostrado e até mesmo entre filtros provenientes do mesmo ponto, como por exemplo entre 4B1 e 4B2. A variação na concentração de DNA entre diferentes pontos é esperada, uma vez que os ambientes são heterogêneos e dispõem de diferentes abundâncias de organismos imediatamente próximo ao local de coleta. A variação entre mesmo ponto pode ser atribuída à técnica de filtração aplicada ou saturação dos poros dos filtros.

Quanto a pureza das amostras, é esperado que na extração de DNA a relação de A260/280 esteja torno de 1,8 (LIMA, 2006). Abaixo desse intervalo, pode ser indicativo de contaminação por reagentes utilizados no processo de extração, enquanto que um valor acima de 2 pode ser indicativo de contaminação por proteínas (SOPHIAN *et al*, 2021). A maioria das amostras apresentou valores de pureza (A260/280) próximos do intervalo considerado satisfatório.

Os resultados das técnicas aplicadas demonstraram resultados divergentes, sobretudo entre cPCR e nPCR. A fim de conferir maior credibilidade quanto a detecção ou não de material genético de *P. insidiosum* nas amostras de eDNA, foram consideradas positivas amostras amplificadas em pelo menos duas das três técnicas aplicadas.

A partir da técnica de cPCR, foram obtidos *amplicons* com tamanho molecular condizentes com os *primers* Pi-1 e Pi-2 (~100 pb) em 31 (77,5%) das 40 amostras avaliadas (Tabela 6) (apêndice 2). Três *amplicons* obtidos na reação de cPCR com *primers* específicos foram enviados para sequenciamento genético (1B1, 4A2, 9C1). Três *amplicons* obtidos na reação de cPCR com *primers* específicos foram enviados para sequenciamento genético (1B1, 4A2, 9C1), confirmando se tratar de *P. insidiosum*.

Quanto os resultados da nPCR, na primeira reação, utilizando *primers* ITS 4 e ITS 5, 18 (45%) amostras foram amplificadas e pode ser observado produtos com diferentes tamanhos moleculares em uma mesma amostra. Utilizando os produtos da primeira reação como alvo na segunda reação, foram gerados *amplicons* em 7 (17,5%) amostras, sendo um deles (1B2) presente apenas na segunda reação (Tabela 6) (Apêndice 3).

A interpretação dos resultados da amplificação por qPCR foi baseada nos critérios determinados a partir da curva de eficiência, considerando positivas amostras com Ct igual ou menor a 25, com *threshold* fixado em 100. Seguindo critérios estabelecidos, foram consideradas positivas 8 (20%) amostras.

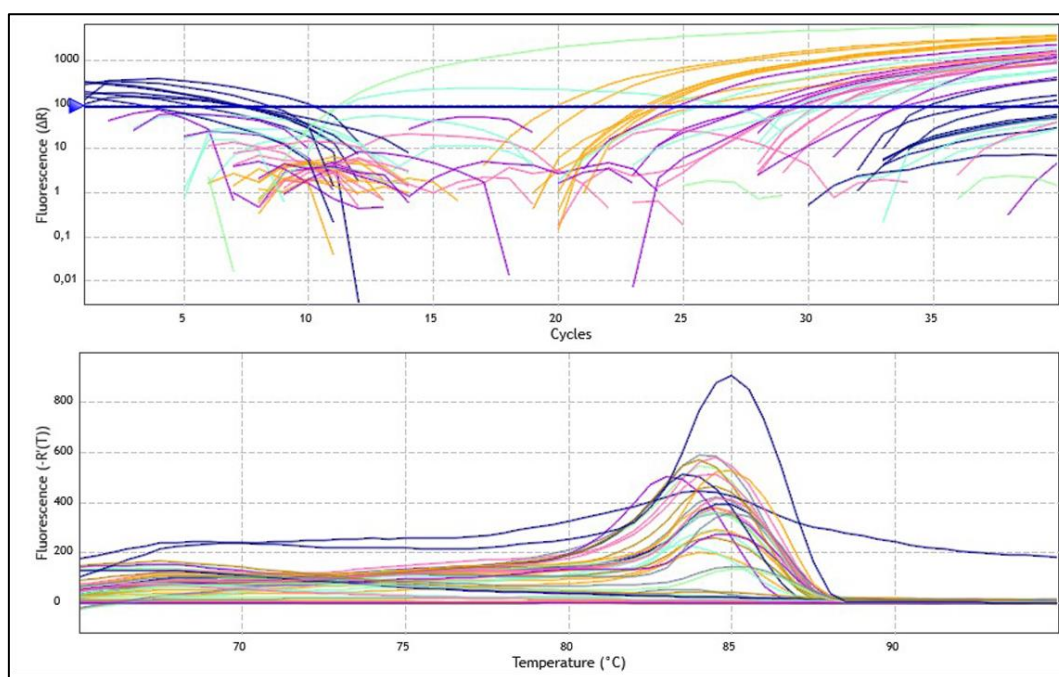


Figura 8 : Curva de amplificação de qPCR aplicada às amostras de eDNA.

Tabela 6: Resultados obtidos em cada uma das técnicas de PCR convencional (cPCR), *nested* PCR (nPCR) e PCR em Tempo Real (qPCR), aplicadas às amostras de eDNA.

Amostra	Técnicas moleculares			Ct	Tm (°C)	Detecção
	cPCR	nPCR	qPCR			
1A1	1	0	0	25,90	84	Negativa
1A2	1	1	1	20,05	84	Positiva
1B1	1	0	1	24,34	84,5	Positiva
1B2	1	1	1	21,38	84	Positiva
2A1	1	1	1	24,03	83	Positiva
2A2	1	1	1	24,22	83,5	Positiva
2B1	1	1	1	23,77	84	Positiva
2B2	1	1	1	23,60	84,5	Positiva
3A1	1	0	0	No Cq	80,5	Negativa
3A2	1	0	0	No Cq	67	Negativa
3B1	1	0	0	No Cq	65	Negativa
3B2	1	0	0	No Cq	65	Negativa
4A1	0	0	0	38,68	83,5	Negativa
4A2	1	0	0	34,93	83,5	Negativa
4B1	1	0	0	37,04	83	Negativa
4B2	0	0	0	No Cq	95	Negativa
5A1	1	0	0	No Cq	67,5	Negativa
5A2	1	0	0	No Cq	67,5	Negativa
5B1	1	0	0	No Cq	67,5	Negativa
5B2	1	0	0	No Cq	84	Negativa
6A1	1	0	0	30,88	84,5	Negativa
6A2	1	0	0	29,64	84,5	Negativa
6B1	1	0	0	25,91	85	Negativa
6B2	1	0	0	31,13	85	Negativa
7A1	0	0	0	30,44	84,5	Negativa
7A2	0	0	0	31,22	84,5	Negativa
7B1	1	0	0	29,34	84,5	Negativa
7B2	0	0	0	32,37	84,5	Negativa
8A1	1	0	0	31,24	84,5	Negativa
8A2	1	0	0	29,86	85	Negativa
9A1	0	0	0	No Cq	67,5	Negativa
9A2	0	0	0	No Cq	67,5	Negativa
9B1	1	0	0	28,06	84,5	Negativa
9B2	1	0	0	28,43	84,5	Negativa
9C1	1	1	0	29,34	84,5	Positiva
9C2	1	0	1	24,94	84,5	Positiva
10A1	1	0	0	29,76	84,5	Negativa
10A2	0	0	0	33,69	85	Negativa
10B1	0	0	0	No Cq	67,5	Negativa
10B2	1	0	0	34,07	85	Negativa

De 40 amostras avaliadas em duplicata, apenas 9 (22,5%) sugerem a presença de material genéticos do patógeno no ambiente de coleta e representando 5 dos 20 pontos avaliados (25%). A detecção do patógeno se concentrou nas regiões de Botucatu/SP (1A2, 1B1, 1B2, 2A1, 2A2, 2B1, 2B2) e São Manuel/SP (9C1 e 9C2) (Tabela 6)(Figura 9).

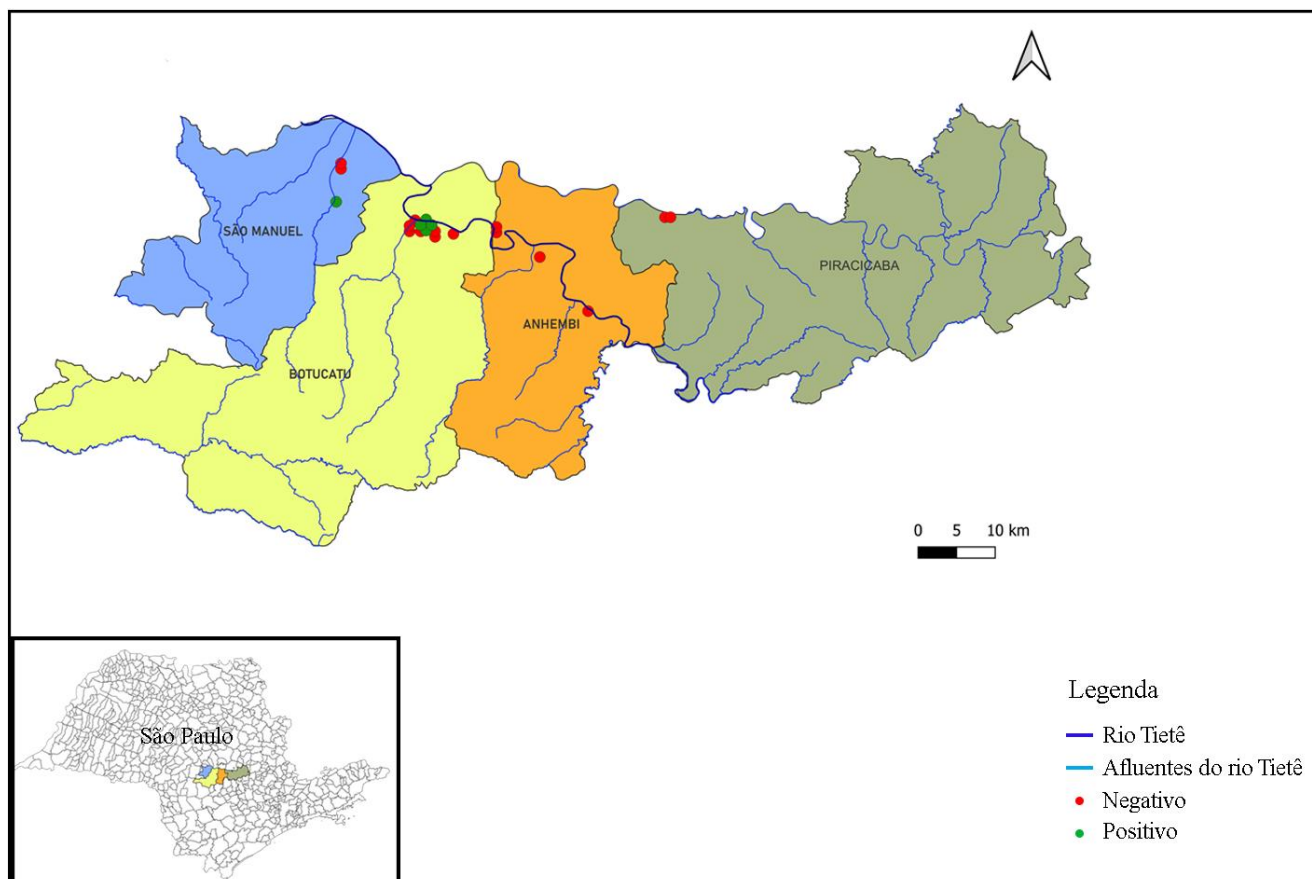


Figura 9: Mapa indicando pontos amostrados que foram positivos e negativos para detecção de *Pythium insidiosum*.

Análises estatísticas

Como parâmetro para definir o teste estatístico a ser aplicado aos dados ambientais de temperatura da água, pH e pluviosidade, foi avaliada a distribuição dos dados em relação a cada um dos grupos (detectado e não detectado). Através do teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), foi avaliado que os dados referentes a temperatura da água ($0,4930 < p < 0,5255$) e pH ($0,2191 < p < 0,6487$) são paramétricos, enquanto que a pluviosidade apresenta dados não paramétricos ($0,0052 < p < 0,0675$).

Os resultados do Teste t para grupos independentes mostraram que os valores médios desses grupos não são significativamente diferentes tanto em relação a temperatura da água

($t(5,945) = 0,5853$, $p = 0,5799$) quanto o pH ($t(18) = 0,4098$, $p = 0,6868$). Foi identificada diferença significativa quanto a variância dos dados de temperatura da água e por isso foi utilizado modelo de Teste t de de Welch, que não pressupõe igualdade entre as variâncias. Para os dados de pluviosidade foi aplicado teste de Mann-Whitney, que apontou não haver diferença significativa entre a mediana dos grupos ($p = 0,6189$) (Figura 10).

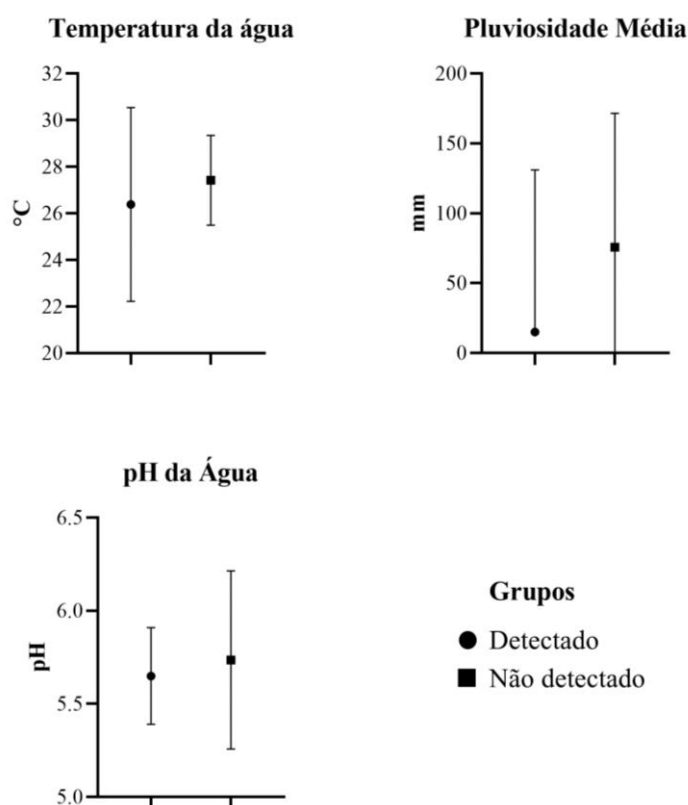


Figura 10: Dados das variáveis ambientais avaliadas, destacando valores de média de cada grupo para variáveis Temperatura da água e pH, e mediana para Pluviosidade.

Discussão

Através dos métodos moleculares empregados no presente estudo, foi detectada a presença de material genético de *P. insidiosum* em cinco dos 20 pontos avaliados, sendo quatro deles localizados na cidade de Botucatu/SP e um em São Manuel/SP (Figura 9). A maior taxa de detecção em Botucatu não representa necessariamente maior predomínio do patógeno na cidade, uma vez que essa fora amostrada em maior número (Tabela 1). No processamento das amostras de eDNA foi adotada uma interpretação conservadora dos dados, de forma que dentre as três técnicas moleculares aplicadas (cPCR, nPCR e qPCR) foram considerados positivos

pontos em que pelo menos duas técnicas demonstraram amplificação do alvo, a fim de eliminar possíveis resultados falso-positivos ou falso-negativos.

Houve divergência entre os resultados obtidos a partir das técnicas moleculares empregadas na análise das amostras de eDNA realizadas em duplicata. Foi observado maior número de resultados positivos através da técnica de cPCR com *primers* Pi-1 e Pi-2, onde 77,5% das amostras foram positivas, seguido da qPCR (20%) e nPCR (17,5%). Desse montante, apenas seis (15%) amostras foram amplificadas nas três técnicas, representadas por 5 pontos de coleta distintos, sendo quatro deles provenientes de pontos geograficamente próximos coletados na cidade de Botucatu, e um de São Manuel/SP (Figura 9). Considerando o baixo limiar de detecção estabelecido para análise dos dados da reação de qPCR, adotando Ct menor ou igual a 25, as amostras consideradas positivas nessa técnica possivelmente continham células do organismo de interesse, uma vez que o diâmetro dos poros do filtro selecionado para filtração da água é menor que o diâmetro dos zoósporos de *Pythium* spp. No entanto, a detecção por métodos moleculares não garante a presença de *P. insidiosum* ou zoósporos dispersos na água no momento da coleta, uma vez que se utilizam de materiais genéticos do organismo presentes no ambiente e que podem perdurar por diferentes períodos de tempo, a depender dos fatores ambientais associados.

Apesar da heterogeneidade da turbidez da água observada entre os pontos de coleta, todos tiveram em comum a presença de matéria orgânica em suspensão, vegetação ripária e/ou de macrófitas aquáticas imediatamente próximos aos locais de coleta. De acordo com Léziart *et al.* (2019), a presença de diferentes substâncias químicas inorgânicas e orgânicas, substâncias húmicas produzidas no processo de decomposição, partículas de sedimentos, microrganismos, biomassa, dentre outros, compõem esse parâmetro limnológicos.

Com base na concentração de DNA presente nas amostras extraídas dos filtrados, o método aplicado nesse estudo indica potencial na dessorção do material genético retido no filtro de NC, que pode ter sido catalisada pela presença de EDTA (LIANG; KEELEY, 2013) na composição do *buffer* de lise do protocolo CTAB. Extrações de eDNA, feitas a partir de filtrados provenientes de ambientes aquáticos com maior concentração de partículas dispersas, tendem a ter uma maior taxa de recuperação de materiais genéticos, sobretudo em ambientes levemente ácidos (LIANG; KEELEY, 2013) (EICHMILLER; MILLER; SORENSEN, 2016). A formação de sorbatos, que proporciona proteção às moléculas de eDNA contra a degradação e possibilita sua recuperação por meio da dessorção. Além disso, a sorção pode ocorrer entre as moléculas de eDNA disposta na água e o material do filtro utilizado, o qual apresenta bom

aproveitamento na retenção dessas moléculas (COBLE *et al.*, 2019). No entanto, a presença de substâncias úmicas na fase de eluição da amostra pode ter influenciado nas reações de PCR, atuando como inibidores da enzima polimerase ou, no caso da qPCR, também interferir na geração de fluorescência, aumentando o número de ciclos necessários para detecção das amostras positivas (SCHRIEWER; WEHLMANN; WUERTZ, 2011). Comparativamente, a técnica de cPCR apresentou maior sensibilidade de detecção em relação a nPCR e qPCR, o que nesse estudo pode ser atribuído à complexidade da matriz das amostras.

A alta taxa de contaminação, oriunda do crescimento simultâneo de bactérias e outros organismos filamentosos nas bordas das iscas, inviabilizou a maioria das tentativas de recuperação de cepas suspeitas de *Pythium* sp., bem como aplicação da técnica de micro cultivo para caracterização morfológica de todos isolados. Apesar disso, foi possível registrar a morfologia de cinco isolados representantes do gênero *Pythium*, identificados como *Pythium longipapillum*, *Pythium catenulatum*, *Pythium insidiosum* e *Pythium* sp. (Tabela 4) (Figura 5). As 14 culturas suspeitas foram submetidas a processamento molecular, utilizando-se as técnicas de cPCR, nPCR e qPCR e *primers* específicos de *P. insidiosum* como alvo. Utilizando mesmo critério adotado para determinar presença de material genético do patógeno em amostras de eDNA, uma das amostras foi positiva para *P. insidiosum*, sendo amplificada nas três técnicas moleculares empregadas (Tabela 5).

O resultado da primeira reação da técnica de nPCR utilizando *primers* universais (ITS 4 e ITS 5) aplicadas às amostras de gDNA, confirma a contaminação das culturas por outros organismos, onde se observa produtos da reação com diferentes pesos moleculares (apêndice 3). Apesar de não haver presença de *amplicon* na primeira reação, a amostra proveniente da cultura C5 foi amplificada na segunda reação, gerando produto de 100 pb condizente com tamanho de fragmento amplificado pelos *primers* Pi-1 e Pi-2, o qual foi sequenciado e identificado como *P. insidiosum*. A cultura foi isolada no mesmo ponto em que foi detectada presença de material genético do patógeno por eDNA (2A). Com esse resultado, é constatado que das 40 amostras de água coletadas, foram isoladas sete representantes do gênero *Pythium* (17,5%) e uma cepa de *P. insidiosum* (2,5%), que representa um baixo percentual de sucesso na recuperação do organismo.

A partir do sucesso no isolamento do patógeno e os resultados obtidos no processamento molecular, pode-se inferir que no momento da coleta havia alta densidade do organismo no ambiente e alta concentração de zoósporos na água, que registrava temperatura abaixo (21°C) da considerada ideal para produção dessa estrutura reprodutiva (35°C). Quanto aos demais

fatores ambientais, nesse ponto de coleta foi observada presença de *E. crassipes* e representantes da família Poaceae, pH ácido (5,3) e registro de 14mm de pluviosidade no intervalo de 15 dias antes da coleta. Esses dados apontam para possibilidade de infecção por *P. insidiosum* mesmo em dias de baixa temperatura e que sucederam períodos chuvosos, conforme observado por Marcolongo *et al.* (2012). Ao avaliar os ambientes quanto a vegetação, JARA *et al.* (2021) também identificaram plantas da família Poaceae constituindo a flora dos locais em que *P. insidiosum* foi detectado. A influência positiva sobre a atração de zoósporos do patógeno por plantas dessa família foi relatada por Miller (1983), porém não se sabe a influência dessa vegetação para o estabelecimento do oomiceto em ambientes naturais, onde há maior diversidade de vegetação. Presser & Goss identificaram presença do oomiceto em ambientes aquáticos com água escura contendo alta concentração de matéria orgânica e poluição proveniente da área urbana, como despejo de esgoto. Os autores também sugerem que a alta densidade de vegetação, sobretudo de gramíneas, pode estar associadas ao desenvolvimento do patógeno naquela região. Os dados ambientais obtidos no local de isolamento do patógeno realizado nesse estudo, corrobora com outros estudos da literatura em que foi confirmada presença de *P. insidiosum*, sob condições ambientais semelhantes. Além da vegetação, a baixa temperatura da água é considerada importante para compreensão da distribuição do organismo no ambiente, podendo atuar como fator limitante (MACHADO *et al.*, 2018) (JARA *et al.*, 2021). O oomiceto pode apresentar uma distribuição mais generalista do que a sugerida na literatura, que apontam para ambientes úmidos e quentes ($\sim 30^{\circ}\text{C}$) como determinantes para seu desenvolvimento no ambiente (MARCOLONGO *et al.*, 2012) (DOS SANTOS *et al.*, 2014).

As análises entre grupos de amostras positivas e negativas para detecção de *P. insidiosum* frente as variáveis ambientais avaliadas não foram significativas ($p < 0,05$). A comparação entre a média de temperatura da água ($p = 0,5799$) e pH ($p = 0,6868$), bem como a mediana da pluviosidade ($p = 0,6189$) indica não haver influência dessas variáveis quanto a presença do patógeno no ambiente. Em relação a temperatura, o resultado da análise estatística corrobora JARA *et al.*, (2021), que sugere o desenvolvimento do oomicetos em faixas amplas de temperatura. A partir dos nossos dados, observamos detecção de *P. insidiosum* em água com temperaturas de 30°C e 21°C . Quanto a pluviosidade, com exceção das coletas 3 e 4, em todos os demais momentos houve registro de chuvas nos dias anteriores à coleta, dificultando analisar sua influência no estabelecimento do organismo no ambiente, considerando o baixo número amostral desse estudo.

Outros estudos apontam dificuldades no isolamento de *P. insidiosum* utilizando método de iscagem, as quais são atribuídas aos múltiplos fatores envolvidos, como necessidade de um ambiente adequado para presença de zoósporos em alta concentração, volume de alíquota coletada e contaminações bacterianas ao longo do processo (ZAMBRANO *et al.*, 2017) (SUPABANDHU *et al.*, 2008).

A associação entre as três técnicas de PCR para detecção da presença do patógeno em amostras de eDNA conferem confiança ao resultado, de forma a mitigar possíveis erros inerentes à prática laboratorial, como erros de pipetagem e dispersão das moléculas alvo eluídas nas soluções de extração (ELLISON *et al.*, 2006). Por se tratar de uma matriz complexa, com alta concentração de material genético proveniente de diferentes organismos e possíveis substâncias inibidoras de reação (Figura 3), se faz necessário uma análise cuidadosa dos resultados obtidos. Para melhor delineamento e escolha do *primers* a serem utilizados nesse tipo de amostra, é importante levar em consideração outras espécies de *Pythium* spp. que podem estar associados ao mesmo micro bioma ocupado por *P. insidiosum*. Mesmo com anelamento inespecífico com outros organismos do grupo de Oomicetos, o jogo de *primers* utilizado nesse trabalho se mostrou eficiente na detecção de *P. insidiosum* em amostras de eDNA, sobretudo com aplicação em cPCR. Essa confirmação é corroborada pelos *amplicons* obtidos a partir das reações com *primers* específicos e que foram sequenciados por método Sanger, conforme descrito na sessão de resultados.

Para aplicação da técnica de qPCR, supomos ser necessário um processamento mais acurado de amostras de eDNA provenientes de ambientes com alta carga de matéria orgânica, como a purificação prévia das amostras (EICHMILLER; MILLER; SORENSEN, 2016), a fim de eliminar possíveis resquícios de substâncias úmicas ou de outra natureza, que podem influenciar na análise dos resultados da reação.

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.L.], 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 lântico. **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.

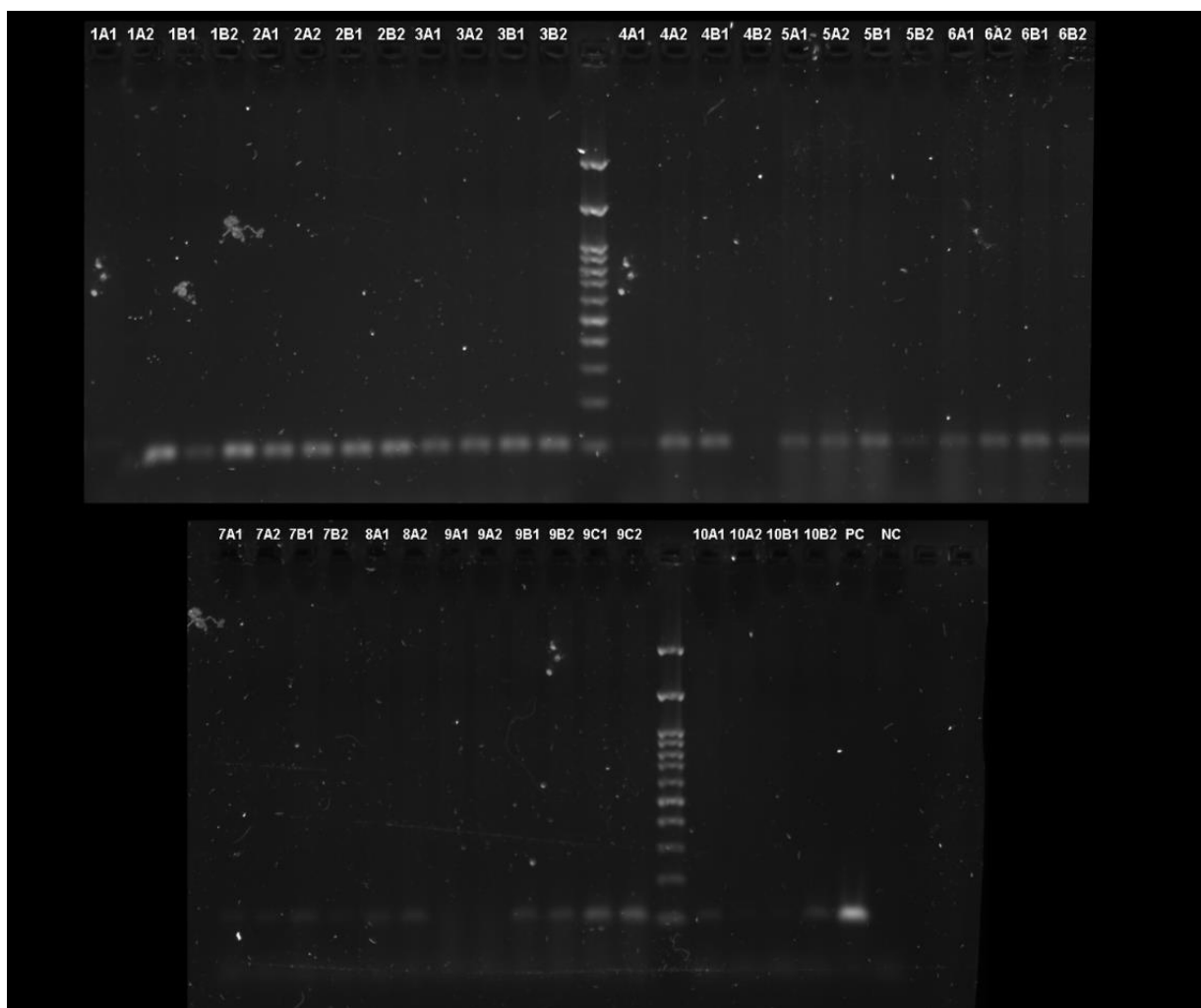
ZARO, D. *et al.* *Pythium insidiosum* em equino: Relato de caso. **Pubvet**, v. 12, n. 12, p. 1–8, dez. 2018.

APÊNDICE

1. Quantificação das amostras de eDNA.

Amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	A260	260/280	260/230
1A1	20,6	0,411	1,71	0,84
1A2	10,1	0,201	1,53	0,63
1B1	26,8	0,535	1,79	0,97
1B2	8,2	0,164	1,67	0,66
2A1	19,1	0,382	1,89	0,57
2A2	13,7	0,275	1,72	0,64
2B1	25,7	0,513	1,91	0,95
2B2	24,4	0,488	1,88	1,19
3A1	417	8,34	3,48	0,63
3A2	380	7,599	3,54	0,63
3B1	314	6,281	3,2	0,68
3B2	282,7	5,655	3,3	0,64
4A1	183	3,66	4,5	0,53
4A2	269,9	5,398	2,15	1,19
4B1	181,4	3,628	2,42	0,74
4B2	527,3	10,546	3,35	0,65
5A1	364,8	7,297	2,06	0,96
5A2	468,4	9,368	2,05	1
5B1	410,4	8,208	2,11	1,05
5B2	340,8	6,817	2,1	1,7
6A1	364,3	7,285	2,07	1,72
6A2	224,8	4,496	2,02	1,15
6B1	247,1	4,942	2,07	1,57
6B2	211,9	4,238	1,97	0,73
7A1	55,6	1,112	1,84	0,49
7A2	11,7	0,234	1,85	0,31
7B1	39	0,779	1,83	1,05
7B2	12,9	0,257	1,96	0,33
8A1	85,2	1,703	1,98	1,17
8A2	106,9	2,137	1,9	1,07
9A1	195,4	3,909	2,01	1,52
9A2	189,2	3,784	2	1,48
9B1	156	3,12	2,05	1,3
9B2	213,9	4,278	2,04	1,52
9C1	237,1	4,742	1,97	1,43
9C2	250,2	5,004	1,87	1,19
10A1	73,5	1,47	1,76	0,87
10A2	6,5	0,13	1,74	0,25
10B1	336,7	6,734	1,48	0,67
10B2	154,4	3,088	1,72	0,69

2. Eletroforese da reação de cPCR de amostras de eDNA, com *primers* Pi-1 e Pi-2.



3. Eletroforese das reações de nPCR de amostras de eDNA. (A) *primers ITS 4 e 5*; (B) *primers Pi-2 e Pi-2*

