

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS FRANCISCO BELTRÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL: ANÁLISE E TECNOLOGIA AMBIENTAL

EMELINE DA SILVA CECCON

**FATORES ABIÓTICOS RELACIONADOS À INCIDÊNCIA E
PREVALÊNCIA DO FUNGO QUITRÍDIO NA RÃ-DAS-
CORREDEIRAS *Limnomedusa macroglossa***

DISSERTAÇÃO

FRANCISCO BELTRÃO

2019

EMELINE DA SILVA CECCON

**FATORES ABIÓTICOS RELACIONADOS À INCIDÊNCIA E
PREVALÊNCIA DO FUNGO QUITRÍDIO NA RÃ-DAS-
CORREDEIRAS *Limnomedusa macroglossa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de “Mestre em Engenharia Ambiental” – Área de Concentração: Análise Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Lingnau
Coorientador: Prof. Dr. Julio Caetano Tomazoni

Francisco Beltrão

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR – Câmpus Francisco Beltrão

C388f	<p>Ceccon, Emeline da Silva Fatores abióticos relacionados à incidência e prevalência do fungo quitrídio na rã-das-corredeiras <i>Limnomedusa macroglossa</i> / Emeline da Silva Ceccon. – Francisco Beltrão: [s.n.], 2019. 34 f.: il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Lingnau Coorientadora: Prof. Dr. Julio Caetano Tomazoni Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Francisco Beltrão, 2019. Bibliografia: f. 26-30</p> <p>1. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>. 2. Fungos patogênicos. 3. Anfíbios. 4. Mata Atlântica. I. Lingnau, Rodrigo, orient. II. Tomazoni, Julio Caetano, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 628</p>
-------	---

TERMO DE APROVAÇÃO

FATORES ABIÓTICOS RELACIONADOS A INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DO FUNGO QUITRÍDIO NA RÃ-DAS-CORREDEIRAS

Limnomedusa macroglossa

por

EMELINE DA SILVA CECCON

Esta dissertação foi apresentada como requisito para a obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL** – Área de Concentração: Análise Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Francisco Beltrão, às 10h do dia 16 de setembro de 2019. O candidato foi avaliado pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____.

Prof. Dr. Rodrigo Lingnau
(Orientador/Presidente – UTFPR)

Prof. Dr. Fernando Cesar Manosso
(Membro titular interno – UTFPR)

Prof. ^a Dr.^a Elaine Maria Lucas Gonsales
(Membro titular externo – UFSM)

Visto da coordenação:

Prof. Dr. Rodrigo Lingnau
(Coordenador do PPGEA)

“A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental”.

Dedico este trabalho à minha
família, pelo incentivo e apoio
incondicional.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não ganharia forma sem a ajuda de Deus e de várias pessoas.

Agradeço primeiramente ao meu orientador Rodrigo Lingnau, por todo o apoio, orientações e paciência diante dos momentos de receio e insegurança, sendo extremamente íntegro e profissional, servindo de inspiração e modelo.

A minha mãe Maria Salete, pelo incentivo e exemplo de perseverança no qual me espelho sempre.

Aos meus queridos irmãos Jean e Dandara, pelo afeto e companhia nos momentos difíceis.

Aos meus colegas do Laboratório de Herpetologia, que tanto me ajudaram durante a coleta dos dados, sem os quais tal pesquisa não teria sido possível: Daiana, Eloize, Jonas, Francisco, Emerson, Talita e Charline.

A equipe do Laboratório do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial a sempre amável e acessível Carolina Lambertini pela realização da *qPCR* e contagem dos zoósporos, e ao Luis Felipe Toledo pelo auxílio na interpretação dos dados.

A banca examinadora formada pelos professores Elaine e Fernando, pelas valiosas contribuições.

A administração do Parque Estadual do Rio Guarani pela disposição do alojamento e aos proprietários da área de acesso ao Rio Guarani.

A esta universidade e seu corpo docente, por possibilitarem a realização de um sonho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

“Ao fim do dia, podemos aguentar muito mais do que pensamos que podemos”.

Frida Kahlo

RESUMO

CECCON, E. S. **Fatores abióticos relacionados a incidência e prevalência do fungo quitrídio na rã-das-corredeiras *Limnomedusa macroglossa***. 2019. 35f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2019.

A quitridiomicose, doença infecciosa emergente causada pelo fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), já foi associada ao declínio de populações e extinção de espécies de anfíbios globalmente e é amplamente detectado na Mata Atlântica. *Limnomedusa macroglossa* é um anuro categorizado como “criticamente em perigo” no estado do Paraná. O presente estudo avaliou potenciais associações entre incidência e prevalência do fungo quitrídio e temperatura e umidade relativa do ar, e temperatura e pH da água, em uma população de *L. macroglossa* no estado do Paraná. O trabalho de campo foi realizado próximo à rodovia PR-484, a jusante da ponte sobre o Rio Guarani, município de Três Barras do Paraná, entre outubro/2017 a setembro/2018. A detecção e quantificação do *Bd* foi realizada através de qPCR, a partir de amostras de secreção cutânea obtida de anuros. Foram amostrados 99 indivíduos, dos quais 34% foram recapturados ao menos uma vez. Confirmamos presença de *Bd* na população amostrada, com prevalência de 17,4%. Detectamos uma associação negativa entre temperatura do ar e prevalência e carga do *Bd*, além de uma associação positiva entre prevalência e carga. A população de *L. macroglossa* analisada está mais suscetível à infecção e maior prevalência por *Bd* durante o inverno. Sugerimos como possível estudo futuro a identificação da linhagem genética de *Bd* existente no local, a fim de determinar medidas efetivas para a conservação de *L. macroglossa*.

Palavras-chave: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Fungos patogênicos. Anfíbios. Mata Atlântica.

ABSTRACT

CECCON, E. S. **Abiotic factors related to the incidence and prevalence of chytrid fungus in the rapids frog *Limnomedusa macroglossa***. 2019. 35f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2019.

Chytridiomycosis, an emerging infectious disease caused by the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), has been associated with population decline and extinction of amphibian species globally and is widely detected in the Atlantic Forest. *Limnomedusa macroglossa* is an anuran categorized as “critically endangered” in the state of Paraná. The present study evaluated potential associations between incidence and prevalence of the fungus chitride and temperature and relative humidity, and water temperature and pH, in a population of *L. macroglossa* in the state of Paraná. The fieldwork was carried out near the PR-484 highway, downstream of the Guarani River bridge, municipality of Três Barras do Paraná, from October / 2017 to September / 2018. The detection and quantification of *Bd* was performed by qPCR, from anuran skin secretion samples. 99 individuals were sampled, of which 34% were recaptured at least once. We confirmed the presence of *Bd* in the sampled population, with a prevalence of 17.4%. We detected a negativa association between temperature and prevalence and *Bd* load, and a positiva association between prevalence and load. The *L. macroglossa* population analyzed is more susceptible to infection and higher prevalence of *Bd* during winter. We suggest as a possible future study the identification of the existing *Bd* genetic line in order to determine effective conservation measures for *L. macroglossa*

KEYWORDS: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Pathogenic fungus. Amphibians. Atlantic forest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa destacando o município de Três Barras do Paraná e área de estudo.....	14
Figura 2. Afloramentos rochosos no Rio Guarani.....	15
Figura 3A e B. Implante de etiqueta alfanumérica em membro inferior esquerdo de <i>L. macroglossa</i> , observado sem luz ultravioleta (A) e com luz ultravioleta (B) para identificação da numeração “A60” do indivíduo.....	17
Figura 4. Prevalência de <i>Bd</i> em relação aos meses de amostragem.....	20
Figura 5. Carga de infecção por <i>Bd</i> em relação aos meses de coleta.....	21
Figura 6. Relação entre a sazonalidade, carga de infecção por <i>Bd</i> e proporção de indivíduos infectados.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalos de Classes.....	18
Tabela 2. Correlação Tetracórica entre os fatores abióticos.....	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Área e período de estudo.....	14
3.2 Coleta de dados.....	16
3.3 Análise estatística.....	19
4 RESULTADOS	19
5 DISCUSSÃO.....	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXO.....	30

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na diversidade de anfíbios, com mais de mil espécies já descritas, e descobertas de novas espécies a cada ano ainda são comuns (SEGALLA et al., 2016; CARDOZO et al., 2018; WALKER et al., 2018; CARVALHO et al., 2019). Os anfíbios são considerados o grupo mais ameaçado entre os vertebrados, com 40% das espécies sob ameaça ou já extintas (IUCN, 2019). Ambos os fatores corroboram para a importância das pesquisas que visam conhecer cada vez mais a biologia e ecologia deste grupo, com o intuito de viabilizar sua conservação.

É possível citar como importantes ameaças à biodiversidade de anfíbios: a perda de habitat, que além de reduzir ambientes viáveis para a sobrevivência dos mesmos, provoca a diminuição do fluxo gênico das populações ao restringir sua capacidade de dispersão geográfica (CUSHMAN, 2006), radiação UV, poluição da água, solo e atmosfera e alterações climáticas (VERDADE, et al., 2010), e ainda, doenças infecciosas emergentes (LONGCORE, 1999; RACHOWICZ et al. 2006; SKERRATT et al. 2007).

Os anfíbios são susceptíveis a diversas doenças infecciosas, causadas por agentes patogênicos tais como ranavírus e fungos quitrídios (LESBARRÈRES et al., 2011; SCHEELE et al., 2019). São conhecidas atualmente duas espécies de fungo quitrídio que têm contribuído vastamente no declínio e/ou extinção de anfíbios ao redor do mundo: o *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) e o *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (SCHEELE et al., 2019). Enquanto o *Bd* já é conhecido desde 1998, e com ampla distribuição pelo globo (BERGER et al., 1998; LONGCORE et al., 1999; SCHEELE et al., 2019), o *Bsal* foi identificado somente recentemente em 2013 (MARTEL et al., 2013).

O *Bd* tem sido relacionado como uma das principais causas para o declínio e extinção de populações de anfíbios (CARVALHO, et al., 2017; JENKINSON, et al, 2016; SCHLOEGEL, et al., 2012), e há uma forte tendência para que esse declínio global seja acentuado no século XXI (HOF, et al. 2011). Através da quitridiomiose ocorre uma infecção do tecido epitelial dos anfíbios, que perturba seu funcionamento normal e ocasiona um desequilíbrio osmótico, provocando a perda de eletrólitos e pode levar à morte (VOYLES, et al., 2007). Já houve detecção de *Bd* em mais de 600 espécies de anfíbios (OLSON E RONNENBERG, 2014), e sabe-se que ela já contribuiu com o declínio de ao menos 501 espécies de anfíbios (SCHEELE et al., 2019).

O quitrídio *Bd* é um fungo aquático, que possui dois estágios de desenvolvimento: um como zoosporângio reprodutivo sésil e um como zoósporo móvel, uniflagelado, liberado do

zoosporângio (LONGCORE, et al., 1999). Os zoósporos locomovem-se pela água, a partir de um centríolo paralelo ligado a membrana plasmática. Possui crescimento exponencial, sendo que um grupo de zoosporângios pode ser gerado a partir de um único zoósporo; infecta tecidos queratinizantes, mas seu desenvolvimento não cessa na ausência de um hospedeiro, podendo sobreviver por algum tempo no ambiente (JOHNSON e SPEARE, 2003; LONGCORE, et al., 1999).

Em laboratório, o fungo demonstra temperatura ótima para seu desenvolvimento entre 17 e 23°C (JOHNSON e SPEARE, 2003; LONGCORE, et al., 1999); variações nos índices de precipitação podem influenciar nas taxas de infecção do *Bd*, pois, embora seja um fungo aquático, o aumento do fluxo da água nas estações chuvosas pode dificultar a fixação do zoósporo no hospedeiro (VALENCIA-AGUILAR, et al., 2016); e o pH ideal para o seu crescimento está entre 6-7, embora possa apresentar atividade em intervalos mais amplos (4-8) (VALENCIA-AGUILAR, et al., 2016; PIOTROWSKI, ANNIS e LONGCORE, 2004),

A perda e fragmentação de habitat em áreas de vegetação nativa provoca um aumento de infecções por *Bd*, pois alterações tanto nos macroclimas quanto em microclimas, podem aumentar a carga do patógeno e modificar os atributos de comunidades, tornando-as mais suscetíveis a infecção pelo fungo (BECKER, et al., 2016).

Ainda, alterações das condições ambientais como temperatura e precipitação, podem desencadear como resposta do fungo o aumento do fator de crescimento frente a condições hostis (JAMES, et al., 2015). Variáveis ambientais como pH da água, precipitação, temperatura da água e temperatura do ar, podem ser preditores significativos da prevalência do fungo em determinadas espécies de anuros (VALENCIA-AGUILAR, et al. 2016). Portanto, uma avaliação da extensão do potencial de infecção do *Bd* depende em parte das características de seu nicho (RON, 2005).

Recentemente foi evidenciado que o fungo quitrídio desempenhou um importante papel nos declínios históricos de populações de anfíbios no Brasil, ocorridos nas décadas de 1970 e 1980 na Mata Atlântica (CARVALHO, et al., 2017). Sabe-se que o *Bd* é amplamente distribuído ao longo do bioma da Mata Atlântica (JENKINSON, et al., 2016; VALENCIA-AGUILAR et al. 2015; LISBOA, et al., 2013).

Pesquisas evidenciaram ainda a existência de novos genótipos do fungo no bioma. Uma linhagem enzoótica *Bd-Brasil*, e uma híbrida entre *Bd-GPL* (Linhagem Panzoótica Global) e *Bd-Brasil* (JENKINSON, et al., 2016; BATAILLE et al. 2013; SCHLOEGEL et al. 2012; FARRER et al. 2011), demonstrando que o *Bd* é mais complexo do que se imaginava por reproduzir-se também de forma sexuada.

Contudo, além dos fatores ambientais, características específicas da espécie, como hábitos de vida e modo reprodutivo podem ajudar a compreender as taxas de incidência e prevalência do fungo (PIOTROWSKI, ANNIS e LONGCORE, 2004). Nesse sentido, conhecer a interação existente entre o patógeno, fatores ambientais e hospedeiro, é uma importante ferramenta para prever e evitar o aumento de declínios de anfíbios causados pela quitridiomiose.

Como já abordado acima, muitas populações de anfíbios podem estar ameaçadas pelo quitrídio, principalmente populações de espécies que já estejam ameaçadas por outros fatores, como atividades agropecuárias, e expansão urbana (ICMBIO, 2016). Nesse contexto, objetivamos analisar a infecção por *Bd* na rã-das-corredeiras, *Limnomedusa macroglossa*, uma rã ameaçada de extinção no estado do Paraná (MIKICH e BÉRNILS, 2004).

Desta forma, a presente dissertação tem como objetivo analisar a relação da incidência e prevalência do fungo quitrídio na rã-das-corredeiras *Limnomedusa macroglossa*, com fatores abióticos, tais como: temperatura do ar, pH da água e umidade relativa do ar. Tendo em vista a complexidade e virulência do fungo *Bd* e sua ampla distribuição no Bioma Mata Atlântica, que abriga expressiva diversidade de anfíbios, os esforços em identificar as espécies que estão infectadas e como reagem ao fungo são fundamentais a fim de estabelecer ações de conservação e evitar o aumento na perda da biodiversidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a incidência e prevalência do fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* na rã-das-corredeiras *Limnomedusa macroglossa* em relação à fatores abióticos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se há relação entre a incidência e prevalência do fungo quitrídio em *L. macroglossa* e umidade relativa do ar, temperatura do ar e pH da água.

Avaliar se a incidência e prevalência do fungo quitrídio em *L. macroglossa* está associada à sazonalidade.

Testar se a incidência e a prevalência do fungo quitrídio em *L. macroglossa* está exercendo influência sobre o tamanho e peso dos indivíduos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA E PERÍODO DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada em um transecto longitudinal de 140 m no Rio Guarani ($25^{\circ} 24' 13.89''$ S, $53^{\circ} 06' 54.03''$ O), tributário da margem direita do baixo rio Iguaçu, próximo à rodovia PR-484, a jusante da ponte sobre o Rio Guarani (Figura 1). A área de estudo localiza-se no leito do rio principal em seu terço inferior, poucos quilômetros antes do leito do rio Guarani sofrer influência do represamento do rio Iguaçu, junto a sua foz. O local de estudos fica em uma área particular na zona rural do município de Três Barras do Paraná, estado do Paraná.

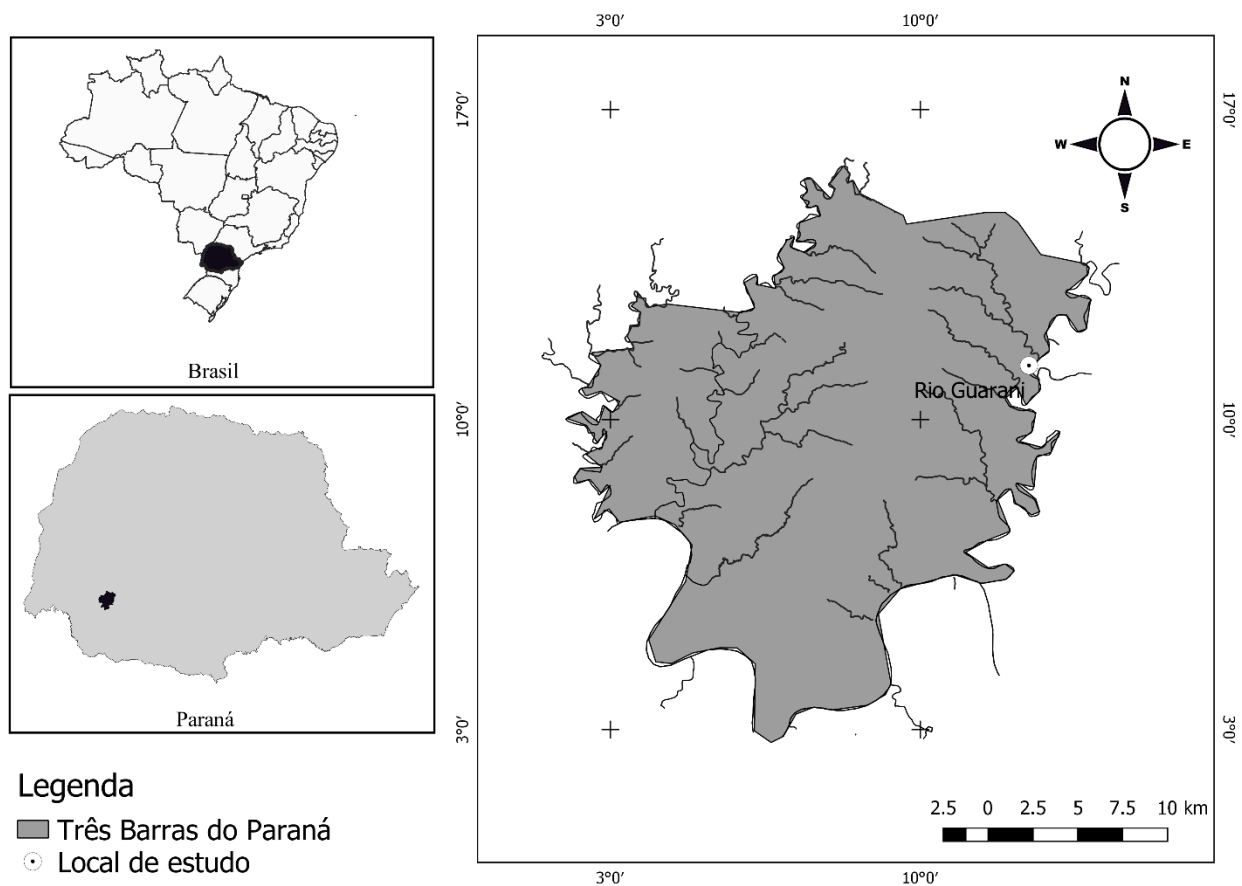


Figura 1 - Mapa destacando o município de Três Barras do Paraná e área de estudo.

O local de estudo fica a cerca de três quilômetros dos limites do Parque Estadual do Rio Guarani, situado em sua zona de amortecimento. Trata-se de uma Unidade de Conservação com superfície total de 2.235 ha de floresta estacional semidecidual e transição para Floresta Ombrófila Mista com *Araucaria angustifolia* (IAP, 2002).

O município de Três Barras do Paraná possui uma área total de 504,171 Km² (IBGE, 2016) e sua vegetação pertence ao bioma Mata Atlântica (S.O.S. MATA ATLÂNTICA, 2016). O clima da região é classificado como *Cfa* (mesotérmico subtropical úmido) de acordo com a classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1.900 a 2.200 mm, temperatura média anual de 18° a 20°C e altitude entre 400 a 600 m (ALVARES et al., 2013).

Os indivíduos da espécie *L. macroglossa* são encontrados em substratos rochosos em área aberta de leitos do rio, onde ficam com o corpo submerso ou completamente fora da água, tais características justificam seu nome popular: “rã-das-corredeiras”. A área de estudos possui condições abióticas favoráveis para reprodução de *L. macroglossa*, com corredeiras, ou seja, trechos do rio em que há maior gradiente topográfico, portanto, maior energia da água e exposição do leito rochoso de basaltos (Figura 2).



Figura 2- Afloramentos rochosos no Rio Guarani.

3.2 COLETA DE DADOS

A coleta dos dados teve início em outubro de 2017 e término em setembro de 2018. As saídas a campo ocorreram das 20 às 24 horas, tendo em vista o hábito predominantemente noturno e período reprodutivo da espécie (KAEFER, BOTH e CECHIN, 2009), totalizando um esforço amostral de 84 horas/pessoa.

Os animais foram localizados e capturados segundo o método do animal focal (ALTMANN, 1974), por meio de busca ativa, com auxílio de lanternas de luz branca. Após localizados, foram coletados em campo os seguintes dados de cada indivíduo: CRC (comprimento rostro cloacal), com uso de paquímetro digital; peso; material micótico, utilizando o método de *swabbing*, em que um *swab* (haste flexível com algodão em uma das extremidades) passado cinco vezes nas regiões inguinal direita e esquerda, interdigitais dos membros inferiores e superiores, direitos e esquerdos (HYATT et al. 2007; LAMBERTINI et al. 2013); temperatura do ar e da água e umidade relativa do ar, com termohigrômetro digital; pH da água, utilizando um pHmetro portátil.

Foram utilizadas luvas descartáveis para o manuseio de cada exemplar, a fim de evitar resultados falso-positivos para *Bd* por contaminação cruzada. Os *swabs* foram acondicionados em microtubos *ependorf*, mantidos congelados a - 20°C.

Cada animal capturado foi identificado com microetiquetas alfanuméricas implantadas na região subcutânea do membro inferior esquerdo, a fim de verificar modificações nos padrões de incidência e prevalência do fungo nos exemplares recapturados ao longo do período de pesquisa (Figura 3).

Foi realizada uma avaliação nos indivíduos em busca de sinais clínicos de quiridiomicose, como: descamação epidérmica anormal, perda celular irregular do tecido epitelial, erosões e segmentos de espessamento acentuado do estrato córneo (hiperqueratose paraqueratótica), hiperplasia moderada do estrato intermediário (acantose) (BERGER, et al. 1998). Os animais foram liberados após essa inspeção e coleta de material micótico, no mesmo local da captura.

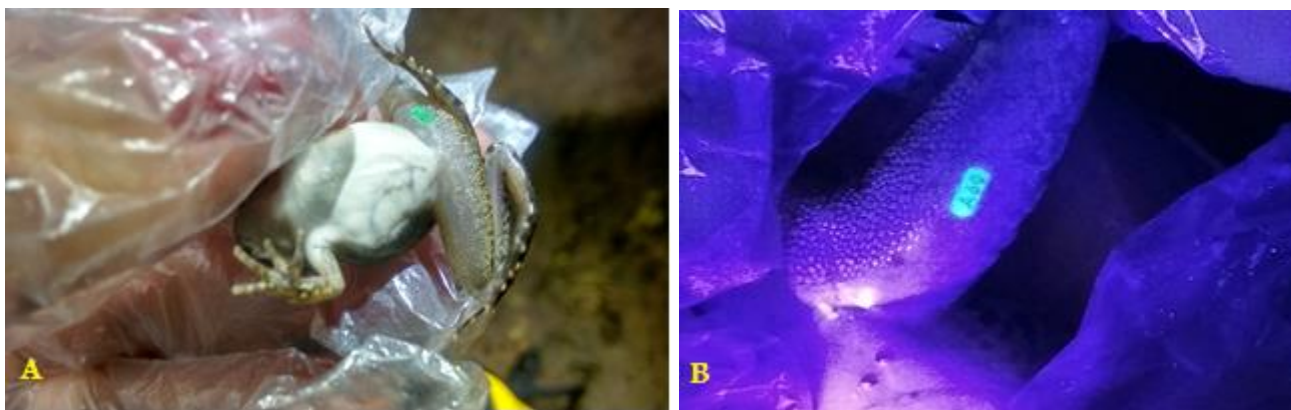


Figura 03- Implante de etiqueta alfanumérica em membro inferior esquerdo de *L. macroglossa*, observado sem luz ultravioleta (A) e com luz ultravioleta (B) para identificação da numeração “A60” do indivíduo.

Os procedimentos para extração do DNA de *Bd* presente nos *swabs*, foram realizados no Laboratório de Biologia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó - UNOCHAPECÓ, e Laboratório de Microbiologia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão – UTFPR-FB, conforme protocolo desenvolvido por Boyle et al. (2004) e alterações feitas por Lambertini et al. (2013).

Para cada microtubo contendo o *swab*, foi adicionado 50 µl do reagente PrepMan™ ULTRA. Em seguida, os microtubos foram agitados em vortex por 45 segundos e centrifugados por 30 segundos a 12.000 RPM; agitados em vortex novamente por 45 segundos e centrifugados por 30 segundos a 12.000 RPM; aquecidos em banho com água a 100°C por dez minutos; resfriados em temperatura ambiente por dois minutos; centrifugados novamente por um minuto a 12.000 RPM. Foi realizada a inversão dos *swabs* dentro dos microtubos utilizando pinças flambadas a cada inversão e centrifugados por cinco minutos a 12.000 RPM. Posteriormente, os *swabs* foram descartados e os microtubos centrifugados por alguns segundos e 45 µL da solução foram transferidos para novos microtubos.

O material genético permaneceu armazenado em freezer à temperatura de - 22°C e foi enviado ao Laboratório de Antígenos Bacterianos, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, para a realização de amplificação do DNA e contagem de zoósporos.

A amplificação do DNA foi realizada através de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando *primers* específicos do *Bd*: *Bd1a* (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3'), e *Bd2a* (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'). Foi preparado um mix de reação contendo 1 µM de cada primer, MgCl₂ (0.9 mM), 1XTaq Buffer, 0.2 mM de cada dNTP e 0.8 U de TaqPolymerase. A amplificação teve as seguintes condições: desnaturação inicial a 93°C por 10 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, cada amplificado foi analisado em gel de agarose 0,7%, com

um DNA *ladder* como um padrão de tamanho de DNA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta, sendo considerado positivo o resultado para presença de *Bd* quando as bandas de amplificação apresentarem cerca de 300 pb (ANNIS et al. 2004; LAMBERTINI, et al., 2013).

Para a contagem dos zoósporos foi preparada uma solução v/v com volume final de 100 µL, contendo a suspensão de zoósporos e iodo a 2%. Após aguardar 10 minutos para a morte e coloração dos zoósporos, ambos os lados de um hemocitômetro (câmara de Neubauer) foram preenchidos com 10 µL da suspensão para realizar a contagem, na qual foram contados zoósporos presentes em 10 quadrados do quadrante central de cada lado da câmara. A média dos 10 quadrados de cada lado foi multiplicada por 25 e o resultado, por sua vez, foi multiplicado por 10 e por 2 devido a diluição com iodo, obtendo-se assim, a média de zoósporos presentes em 1 µL. O número de zoósporos da suspensão foi 2×10^6 para iniciar a diluição seriada, e a contagem foi repetida no mínimo 10 vezes (LAMBERTINI, et al., 2013).

A fim de realizarmos as análises estatísticas de correlação, estabelecemos intervalos de classes para os valores coletados referente à temperatura do ar, umidade relativa do ar, pH da água, CRC e peso (Tabela 1).

Tabela 1 – Intervalos de Classes

Fatores	Classes	Valores
Prevalência	0	Negativo
	1	Positivo
Temperatura	-1	≤ 17
	0	17,1 - 24
	1	> 24
pH	-1	≤ 7
	0	7,1 - 8,5
	1	> 8,5
Umidade	-1	≤ 76
	0	77 - 87
	1	> 87
Sazonalidade	0	Verão
	1	Inverno
Peso	-1	≤ 9
	0	9,1 a 18
	1	> 18
CRC	-1	16 – 35
	0	35 – 54
	1	> 54

Ao final do período de amostragem, foram coletados dois indivíduos adultos como testemunhos, tombados na Coleção Herpetológica do Laboratório de Biologia da Universidade Tecnológica Federal – UTFPR, Campus Francisco Beltrão (Licença SISBIO nº 60566-1).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência de infecção foi estimada com base na proporção de indivíduos com resultado positivo para *Bd* em relação ao total de indivíduos amostrados, durante todo o período de coleta. A incidência (intensidade da infecção) foi medida a partir do número de equivalentes genômicos (GE), por swab.

A correlação entre prevalência e incidência, e os fatores abióticos: pH da água, umidade, e temperatura do ar, além do peso e CRC, foi analisada através de Coeficiente de Correlação Tetracórico. Para a análise de variância entre os tratamentos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do Software R (versão 3.4.0).

Foram estabelecidos intervalos de classes (-1, 0 e 1) entre os dados coletados para prevalência do fungo, pH da água, temperatura do ar, umidade relativa do ar, peso e CRC, a partir de média aritmética para a verificação de coeficiente de correlação.

4 RESULTADOS

Foram coletadas 177 amostras de material micótico de indivíduos de *L. macroglossa*, além de dados como: peso, CRC, pH da água, umidade relativa do ar, temperatura do ar e temperatura da água (Tabela 1 em anexo); dos 99 indivíduos amostrados, 33 foram recapturados uma ou mais vezes.

Das 177 amostras analisadas, 31 apresentaram resultado positivo para infecção por *Bd*, apresentando prevalência de 17,4%. A prevalência apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) com a temperatura e a sazonalidade. A Incidência (carga genômica do fungo por amostra) apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) apenas com a sazonalidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Correlação Tetracórica entre os fatores abióticos

	Prevalência	Incidência	pH	Temperatura do ar	Umidade	Sazonalidade
Prevalência	1.00					
Incidência	0.40	1.00				
pH	-0.10	-0.04	1.00			
Temperatura	-0.44	-0.15	-0.08	1.00		
Umidade	-0.03	0.04	0.06	-0.33	1.00	
Sazonalidade	0.63	0.23	0.35	-0.89	0.11	1.00

A temperatura do ar apresentou influência significativa (valor- $p < 0,05$) sobre a prevalência e incidência de *Bd*. Os resultados dos testes indicam maiores valores de prevalência e incidência nas temperaturas baixas (nível -1), quando comparada com as temperaturas médias e altas.

Os meses de julho, agosto e setembro foram os meses de coleta que obtiveram maior percentual de prevalência (acima de 30%), sendo que em agosto esse percentual foi de 66,6%. A média das temperaturas para os meses de julho, agosto e setembro foram de 18, 17 e 20°C, respectivamente (Figuras 4 e 5).

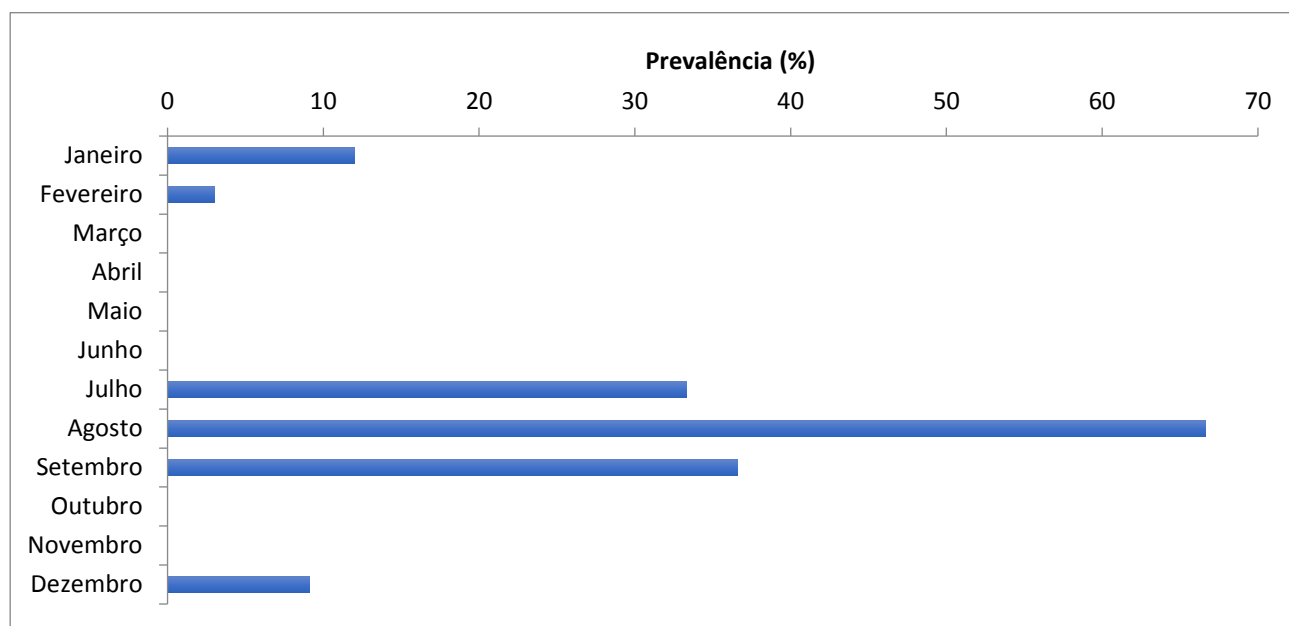


Figura 4 – Prevalência de *Bd* em relação aos meses de amostragem.

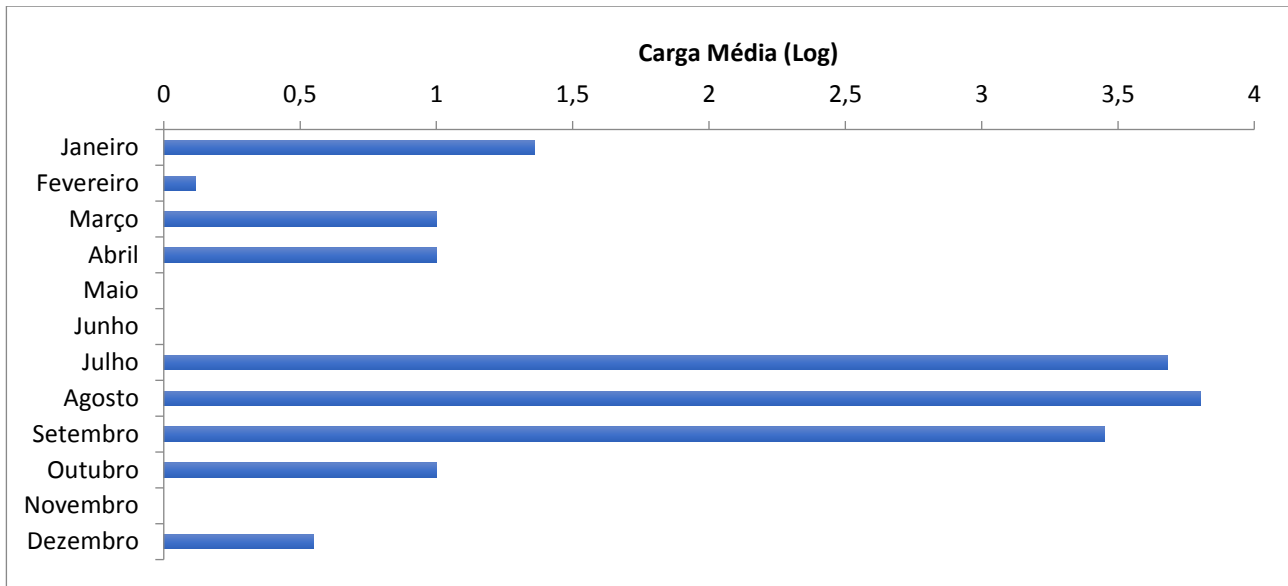


Figura 5 – Carga de infecção por *Bd* em relação aos meses de coleta.

A sazonalidade apresentou-se como fator determinante na relação carga de infecção e proporção de indivíduos infectados (Figura 6). Durante a primavera e o verão, 7% dos indivíduos amostrados apresentaram resultado positivo para contaminação por *Bd*, enquanto que no outono e inverno, esse percentual foi de 36,5.



Figura 6 – Relação entre a sazonalidade, carga de infecção por *Bd* e proporção de indivíduos de *L. macroglossa* infectados.

Não há correlação entre peso e CRC, e prevalência e incidência e não foram avistados anuros mortos ou com sinais clínicos de quitridiomycose no local de estudo.

5 DISCUSSÃO

Das amostras analisadas no presente trabalho, 17,4% apresentaram resultado positivo para infecção por *Bd*, confirmando a hipótese de que há a contaminação pelo patógeno na população de *L. macroglossa* avaliada. Dados esses, que contribuem com a literatura em relação à premissa de que no Bioma Mata Atlântica, a presença do fungo é amplamente distribuída (JENKINSON, et al., 2016; VALENCIA-AGUILAR et al. 2015; LISBOA, et al., 2013). O presente trabalho aponta o primeiro registro do fungo quitrídio em *Limnomedusa macroglossa*.

Dentre os fatores abióticos analisados neste estudo (pH da água, umidade relativa do ar e temperatura do ar), detectamos associação entre prevalência e incidência com temperatura do ar e sazonalidade. Confirmamos que o fungo requer temperaturas mais baixas para seu desenvolvimento (JOHNSON e SPEARE, 2003; LONGCORE, et al., 1999). A sazonalidade pode influenciar diretamente no microbioma cutâneo dos anfíbios, fator que interfere na resistência do hospedeiro frente a infecção por *Bd*. Estudos realizados por Kueneman, et. al., 2019, demonstrou que a temperatura mínima do mês mais frio do ano foi o fator mais forte correlacionado à riqueza microbiana na pele dos anfíbios, indicando que a temperatura e a estabilidade sazonal da temperatura são as que melhor predizem a riqueza microbiana.

Variáveis ambientais como pH da água (VALENCIA-AGUILAR, et al., 2016; PIOTROWSKI, ANNIS e LONGCORE, 2004), precipitação (RUGGERI et al. 2015, BECKER et al. 2016, LAMBERTINI et al. 2017), dossel (PUSHENDORF et al. 2009, BECKER et al. 2012, BECKER et al. 2016), altitude (LAMBERTINI et al. 2016), além do desmatamento (BECKER e ZAMUDIO 2011) e ação antrópica (BECKER et al. 2016, CARVALHO et al. 2017), podem ser preditores significativos da prevalência e incidência do fungo em determinadas espécies de anuros (VALENCIA-AGUILAR, et al. 2016).

L. macroglossa está categorizada como “menos preocupante” nas listas global e brasileira de fauna ameaçada (IUCN, 2017; ICMBIO, 2016), porém, como “criticamente em perigo” de acordo com o Livro Vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná. Seu declínio no estado estaria relacionado à construção de usinas hidrelétricas, como as usinas de Salto Caxias e Salto Segredo (MIKICH e BÉRNILS, 2004), em que áreas propícias para sua

reprodução e desenvolvimento ficaram submersas. Não foram avistados anuros com sinais clínicos de quitridiomycose durante as expedições. Em algumas espécies, a doença pode ocasionar o rompimento de funções fisiológicas da pele, como a respiração cutânea e osmoregulação, resultando em desequilíbrios eletrolíticos fatais (VOYLES, et al., 2007) ou, no comprometimento do desenvolvimento dos indivíduos infectados. Sinais clínicos como: descamação epidérmica anormal, perda celular irregular do tecido epitelial, erosões e segmentos de espessamento acentuado do estrato córneo (hiperqueratose paraqueratótica), hiperplasia moderada do estrato intermediário (acantose), foram identificados por Berger, et al. 1998, em anfíbios da Austrália e América Central, infectados por *Bd*.

Contudo, em algumas espécies, embora haja a presença do fungo, declínio e letalidade não são evidentes. Isso pode ocorrer devido a fatores que contribuem para a suscetibilidade da espécie diante do *Bd*, como: tamanho grande, alcance restrito, vida em altitude, especialidade ecológica e baixa fecundidade (LIPS et al. 2003 ; MURRAY e HOSE 2005; WILLIAMS e HERO, 1998).

São necessários mais estudos a cerca das linhagens de *Bd* presentes na região a fim de contribuir para explicar a origem e distribuição do patógeno. A variação entre as linhagens do quitrídio é reflexo da adaptação aos diversos ambientes que ocupa, podendo aumentar o efeito de transmissão ou de contaminação nas populações (LAMBERTINI et al., 2016). Compreender a dinâmica entre patógeno e hospedeiro é essencial, para minimizar os efeitos deletérios de doenças emergentes em espécies suscetíveis. Sugere-se ainda, identificar a diversidade do microbioma presente na população de *L. macroglossa* no local de estudo, em detrimento da sazonalidade, a fim de melhor compreender a dinâmica da resposta imune da espécie hospedeira frente ao patógeno.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante todo o esforço amostral em campo, foram avistados girinos e indivíduos pós-metamórficos em considerável quantidade, demonstrando que o local de estudos é favorável para reprodução e desenvolvimento de *L. macroglossa*, o que o torna relevante para estudos futuros com a espécie (parasitismo, monitoramento, comportamento, predação, dieta, ecologia, etc.).

Sugere-se ainda, como possibilidade de estudos futuros, identificar qual é o genótipo de *Bd* presente no Rio Guarani (se *Bd-GPL*, *Bd-Brasil*, híbrido *Bd-GPL/Bd-Brasil*, ou genótipo

ainda não descoberto), a fim de prever futuras emergências, novas afiliações do hospedeiro e desfechos da doença em diferentes cenários ambientais (JENKINSON, et al., 2016; WOOD et al. 2012; FISHER et al. 2001; BURT et al. 1996); e identificar possíveis alterações fisiológicas ocasionadas em *L. macroglossa* devido a contaminação por *Bd*, como resposta imune e composição do microbioma (BECKER, et al., 2017), tendo em vista que a susceptibilidade de adultos, metamorfos e girinos à infecção varia entre espécies, populações e locais (VALENCIA-AGUILAR, et al. 2016; KILPATRICK et al., 2010; FISHER et al., 2009).

A partir das contribuições da presente pesquisa, ressaltamos a relevância do constante trabalho de monitoramento das populações de anuros presentes no Bioma Mata Atlântica em detrimento da contaminação por *Bd*, avaliando sua resposta imune frente a contaminação, considerando a ampla distribuição do patógeno no bioma.

REFERÊNCIAS

- ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods behaviour, v. 49, n. 3, p. 227-267, 1974.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- ANNIS, S.L.; DASTOOR, F. P.; ZIEL, H.; DASZAK, P.; LONGCORE, J. E. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. Journal of Wildlife Diseases, v. 40, p. 420-428, 2004.
- BATAILLE, A.; FONG, J. J.; CHA, M.; WOGAN, G. O. U.; BAEK, H. J.; LEE, H.; MIN, M. S.; WALDMAN, B. Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. Molecular Ecology, v. 22, p. 4196 - 4209, 2013.
- BECKER, C. G.; RODRIGUEZ, D.; LONGO, A. V.; TOLEDO, L. F.; LAMBERTINI, C.; LEITE, D. S.; HADDAD, C. F. B.; ZAMUDIO, K. R. Deforestation, host community structure, and amphibian disease risk. Basic and Applied Ecology, v. 17, p. 72-80, 2016.
- BECKER, C. G.; LONGO, A. V.; HADDAD, C. F. B.; ZAMUDIO, K. R. Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. Proc Biol Sci., B284:20170582, 2017.
- BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN D. E.; CUNNINGHAM, A. A.; GOGGIN, C. L.; SLOCOMBE, R.; RAGAN, M. A.; HYATT, A.D.; MCDONALD, K. R.; HINES, H. B.; LIPS K. R.; MARANTELLI, G.; PARKES, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 95, p. 9031–9036, 1998.
- BOYLE, D. B.; OLSEN, V.; MORGAN, J.A.T.; HYATT, A. D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Diseases of Aquatic Organisms, v. 60, p. 141-148, 2004.
- BURT, A.; CARTER, D. A.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, p. 770–773, 1996.
- CARDOZO, D. E.; BALDO, D.; PUPIN, N.; GASPARINI, J. L.; HADDAD, C. F. B. A new species of *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperinae) from Espírito Santo, Brazil. PeerJ, V. 6, p. e4766, 2018.
- CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibians declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. The Royal Society. Proc Biol Sci. 2017 Feb 8;284(1848). pii: 20162254. doi: 10.1098/rspb.2016.2254

CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A.; ÂNGULO, A.; HADDAD, C. F. B.; PELOSO, P. L. V. A new Amazonian species of *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) from the Brazilian state of Pará: a tody-tyrant voice in a frog. *American Museum Novitates*, 3919, p. 1-21, 2019.

CUSHMAN, S. A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, v. 128, p. 231-240, 2006.

FARRER, R. A.; WEINERT, L. A.; BIELBY, J.; GARNER, T. W. J.; BALLOUX, F.; CLARE, F.; BOSCH, J.; CUNNINGHAM, A. A.; WELDON, C.; PREEZ, L. H.; ANDERSON, L.; POND, S. L. K.; SHAHAR-GOLAN, R.; HENK, D. A.; FISCHER, M. C. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 18732–18736, 2011.

FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T.J.; SAN-BLAS, G.; NEGRONI, R.; ALVAREZ, I. G.; WANK, B.; TAYLOR, J. W. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 4558–4562, 2001.

FISHER, M.C.; GARNER, T.W.J.; WALKER, S. F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 291–310, 2009.

FROST, D. R. Amphibian Species of the world: an online reference. Version 6.0. – American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em 29 abr. 2018.

HOF, C.; ARAÚJO, M. B.; JETZ, W.; RAHBEEK, C. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature*, v. 16, 2011.

HYATT, A. D.; BOYLE, D. G., OLSEN, V.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIGER, K.; HERO, A.; HINES, H.; PHILLOT, R.; CAMPBELL, R.; MARANTELLI, G.; GLEASON, F.; COLLING, E. A. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 73, p. 175-192, 2007.

IAP 2002. Plano de manejo do Parque Estadual do Rio Guarani. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/pagina-1224.html>. Acesso em 25 jan. 2019.

IBGE 2016. Cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/tres-barras-do-parana/panorama>. Acesso em 29 abr. 2018.

ICMBIO 2016. Sumário Executivo – Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf. Acesso em 13 maio 2018.

IUCN – International Union for Conservation of Nature, Conservation International & Nature Serve (2004): *Limnomedusa macroglossa*. – The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em 01 maio 2018.

JAMES, T. Y.; TOLEDO, L. F.; RÖDDER, D.; SILVA, L. D.; BELASEN, A. M.; BETANCOURT-ROMÁN, C. M.; JENKINSON, T. S.; SOTO-AZAT, C.; LAMBERTINI, C.; LONGO, A. V.; RUGGERI, J.; COLLINS, J. P.; BURROWES, P. A.; LIPS, K. R.; ZAMUDIO, K. R.; LONGCORE, J. E. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and evolution*, v. 5, n.18, p. 4079-4097, 2015.

JENKINSON, T. S.; BETANCOURT-ROMÁN, C. M.; LAMBERTINI, C.; VALENCIA-AGUILAR, A.; RODRIGUEZ, D.; NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; RUGGERI, J.; BELASEN, A. M.; SILVA, D. L.; ZAMUDIO, K. R.; LONGCORE, K. R.; TOLEDO, L. F.; JAMES, T. Y. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. *Molecular Ecology*, v. 25, p. 2978-2996, 2016.

JOHNSON, M.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n.8, 2003.

KAEFER, I. L.; BOTH, C.; CECHIN, S. Z. Breeding biology of the rapids frog *Limnomedusa macroglossa* (Anura: Cycloramphidae) in southern Brazil. *Journal of Natural History*, v. 43, n. 19, p. 1195-1206, 2009.

KILPATRICK, A. M.; BRIGGS, C. J.; DASZAK, P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 25, p. 109–118, 2010.

KUENEMAN, J.G., BLETZ, M.C., MCKENZIE, V.J. et al. 2019. Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. *Nature Ecology and Evolution*, v. 3, p. 381-389, 2019.

KWET, A; LINGNAU, R; DI-BERNARDO, M. Pró-Mata: anfíbios da Serra Gaúcha, sul do Brasil. Porto Alegre: Edipucrs, 2010. 108 p.

LAMBERTINI, C.; RODRIGUEZ, D.; BRITO, F. B.; LEITE, D. S.; TOLEDO, L. F. Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Métodos em Herpetologia*. *Herpetologia Brasileira*, v. 2, n. 1, p. 12-17, 2013.

LESBARRÈRES, D.; BALSEIRO, A.; BRUNNER, J.; CHINCHAR, V. G.; DUFFUS, A.; KERBY, J.; MILLER, D. L.; ROBERT, J.; SCHOCK, D. M.; WALTZEK, T.; GRAY, M. J. Ranavirus: past, present and future. *Biology Letters*, rsbl.2011.0951, p. 1-3, 2011.

LIRA, S. A. Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

LISBOA, B. S.; DE MOURA, J. M. N.; DO NASCIMENTO, F. A. C.; TAVARES, L. B.; MOTT, T. New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Atlantic forest of Northeastern Brazil. *NorthWestern Journal of Zoology*, v. 9, p. 210–213, 2013.

LIPS, K. R.; REEVE, J. D.; WITTERS, L. R. Traços ecológicos que predizem declínios na população de anfíbios na América Central. *Conservation Biology*, v. 17, p. 1078 – 1088, 2003.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, v. 91, p. 219–227, 1999.

MARTEL, A.; SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A.; BLOOI, M.; BERT, W.; DUCATELLE, R.; FISHER, M. C.; WOELTJES, A.; BOSMAN, W.; CHIERS, K.; BOSSUYT, F.; PASMANS, F. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 38, p. 15325 - 15329, 2013.

MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R.S. Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba. Governo do Paraná, 2004. 764 p.

MURRAY, B. R.; HOSE, G.C. História de vida e correlatos ecológicos de declínio e extinção na fauna endêmica de anuros australianos. *Ecologia Australiana*, v. 30, p. 564 – 571, 2005.

PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, S. L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, v. 96, p. 9–15, 2004.

RON, S. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, v. 37, p. 209–221, 2005.

RACHOWICZ, L. J.; KNAPP, R. A.; MORGAN, J. A.; STICE, M. J.; VREDENBURG, V. T.; PARKER, J. M.; BRIGGS, C. J. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, v. 87, p. 1671–1683, 2006.

SCHEELE, B. C.; PASMANS, F.; SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; MARTEL, A.; BEUKEMA, W.; ACEVEDO, A. A.; BURROWES, P. A.; CARVALHO, T.; CATENAZZI, A.; DE LA RIVA, I.; FISHER, M. C.; FLECHAS, S. V.; FOSTER, C. N.; FRÍAS-ÁLVAREZ, P.; GARNER, T. W. J.; GRATWICKE, B.; GUAYASAMIN, J. M.; HIRSCHFELD, M.; KOLBY, J. E.; KOSCH, T. A.; LA MARCA, E.; LINDENMAYER, D. B.; LIPS, K. R.; LONGO, A. V.; MANEYRO, R.; MCDONALD, C. A.; MENDELSON, J.; PALACIOS-RODRIGUEZ, P.; PARRA-OLEA, G.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L.; RÖDEL, M.-O.; ROVITO, S. M.; SOTO-AZAT, C.; TOLEDO, L. F.; VOYLES, J.; WELDON, C.; WHITFIELD, S. M.; WILKINSON, M. ZAMUDIO, K. R.; CANESSA, S. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, v. 363, p. 1459-1463, 2019.

SCHLOEGEL, L. M.; TOLEDO, L. F.; LONGCORE, J. E.; GREENSPAN, S. E.; VIEIRA, C. A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C. M.; HIPOLITO, M.; CUOMO, C. A.; JAMES, T. Y. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, v. 21, p. 5162-5177, 2012.

SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; BERNECK, B. V. M.; LANGONE, J. A. Anfíbios brasileiros: lista de espécies. 2016. Disponível em: <http://sbherpetologia.org.br/wp-content/uploads/2016/10/Segallaetal2016-1.pdf>. Acesso em: 02 maio. 2018.

S.O.S. MATA ATLÂNTICA. Mapas. Disponível em: <http://mapas.sosma.org.br/>. Acesso em 29 abr. 2018.

SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; SPEARE, R.; CASSHINS, S.; MCDONALD, K. R.; PHILLOTT, A.; HINES, H. B.; KENYON, N. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, v. 4, p. 125–134, 2007.

VALENCIA-AGUILAR, A.; RUANO-FAJARDO, G.; LAMBERTINI, C.; SILVA, D. L.; TOLEDO, L. F.; MOTT, T. The chytrid fungus acts as a generalist pathogen that infects species-rich amphibian families in Brazilian rainforests. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 114, p. 61–67, 2015.

VALENCIA-AGUILAR, A.; TOLEDO, L. F.; VITAL, M. V. C.; MOTT, T. Seasonality, environmental factors, and host behavior linked to disease risk in stream-dwelling tadpoles. *Herpetologica*, v. 72, n. 2, p. 98-106, 2015.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 68, p. 161-172, 2010.

VOYLES, J.; BERGER, L.; YOUNG, S.; SPEARE, R.; WEBB, R.; WARNER, J.; RUDD, D.; CAMPBELL, R.; SKERRATT, L. F. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organism*, v. 77, p. 113-118, 2007.

WALKER, M.; WACHLEVSKI, M.; NOGUEIRA-COSTA, P.; GARCIA, P. C. A.; HADDAD, C. F. B. A new species of *Fritziana* Mello-Leitão 1937 (Amphibia: Anura: Hemiphractidae) from the Atlantic Forest, Brazil. *Herpetologica*, v. 74, p. 329-3341, 2018.

WILLIAMS, S. E.; HERO, J. M. Rãs da floresta tropical dos trópicos úmidos australianos: classificação de guildas e similaridade ecológica de espécies em declínio. *Proceedings da Royal Society of London. Series B-Ciências biológicas*, v. 265, p. 597 – 602, 1998 .

WOOD, J. L.; LEACH, M.; WALDMAN, L.; MACGREGOR, H.; FOOKS, A. R.; JONES, K. E.; RESTIF, O.; DECHMANN, D.; HAYMAN, D. T.; BAKER, K. S.; KAMINS, A. O.; FAHR, J.; NTIAMOA-BAIDU, Y.; SUU-IRE, R.; BREIMAN, R. F.; EPSTEIS, J. H.; FIELD, H. E.; CUNNINGHAM, A. A. A framework for the study of zoonotic disease emergence and its drivers: spillover of bat pathogens as a case study. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, v. 367, p. 2881–2892, 2012.

ANEXOS

Tabela 1. Dados coletados no momento da captura de cada indivíduo, em que “R” refere-se a quantas vezes o espécime foi recapturado.

Identificação	Infecção por Bd	Data de coleta	Peso (g)	pH	Temp. do ar (C°)	Umidade	CRC (mm)
A06	Negativa	14/10/2017	08.3	6.03	22.7	71	43.41
A05	Negativa	14/10/2017	12.4	6.15	21.3	99	44.98
A07	Negativa	15/10/2017	01.8	6.98	25.8	67	23.24
A08	Negativa	15/10/2017	01.6	6.24	25.6	75	21.95
A09	Negativa	15/10/2017	00.8	6.80	23.6	83	16.95
A06 R1	Negativa	22/12/2017	13.0	8.17	25.0	99	45.57
A11	Negativa	22/12/2017	09.6	8.05	24.2	99	43.05
A12	Negativa	22/12/2017	01.4	8.38	24.1	99	21.94
A13	Negativa	22/12/2017	01.5	8.24	24.0	99	24.55
A14	Negativa	22/12/2017	13.2	8.86	24.4	99	46.10
A15	Negativa	22/12/2017	12.6	7.52	24.0	99	43.60
A20	Negativa	22/12/2017	26.1	7.62	23.7	99	57.27
A18	Negativa	22/12/2017	13.7	8.15	23.7	99	50.58
A19	Negativa	22/12/2017	20.6	7.75	23.5	99	54.29
A21	Positiva	23/12/2017	11.1	8.02	25.5	99	43.63
A22	Negativa	23/12/2017	04.9	7.91	25.7	99	40.01
A23	Positiva	04/01/2018	10.6	7.72	27.9	77	51.12
A31	Positiva	04/01/2018	21.4	6.27	26.3	82	48.53
A26	Negativa	04/01/2018	11.6	6.27	26.3	82	45.61
A22 R1	Negativa	04/01/2018	07.7	6.81	23.3	87	41.21
A15 R1	Positiva	04/01/2018	11.6	6.81	23.3	87	44.54
A05 R1	Negativa	04/01/2018	13.3	6.50	23.5	99	46.06
A27	Negativa	04/01/2018	14.1	6.50	23.5	99	48.72
A24	Negativa	04/01/2018	10.8	6.15	22.0	99	46.12
A28	Positiva	04/01/2018	18.4	6.90	23.1	95	52.71
A29	Negativa	04/01/2018	08.9	6.75	22.6	89	43.74
A06 R2	Negativa	04/01/2018	11.7	5.93	22.0	93	44.57
A20 R1	Negativa	04/01/2018	26.0	6.21	23.0	94	61.97
A32	Positiva	05/01/2018	01.3	6.70	26.4	78	23.05
A40	Negativa	05/01/2018	09.6	6.55	26.0	83	40.63
A34	Negativa	05/01/2018	07.8	6.61	25.7	80	39.72
A35	Negativa	05/01/2018	24.6	6.65	22.2	95	56.38
A29 R1	Negativa	12/01/2018	09.3	6.50	25.2	92	41.79
A40 R1	Negativa	12/01/2018	09.8	6.41	23.6	99	52.51
A20 R2	Negativa	12/01/2018	25.2	6.59	24.5	99	73.22
A15 R2	Positiva	12/01/2018	11.8	6.83	24.5	99	45.05
A36	Negativa	12/01/2018	19.4	6.28	23.8	99	52.01

A34 R1	Negativa	12/01/2018	10.5	7.17	23.6	99	40.89
A27 R1	Negativa	12/01/2018	14.7	6.70	23.3	99	50.12
A14 R1	Negativa	12/01/2018	13.0	6.69	22.7	99	46.07
A37	Negativa	12/01/2018	08.5	6.80	22.9	99	40.85
A38	Negativa	25/01/2018	02.6	6.79	30.0	67	28.01
A19 R1	Negativa	25/01/2018	21.5	7.52	29.4	71	54.67
A37 R1	Negativa	25/01/2018	09.7	6.50	29.0	70	43.01
A39	Negativa	25/01/2018	03.8	6.23	26.8	80	34.45
A27 R2	Negativa	25/01/2018	14.7	9.06	28.5	73	50.55
A06 R3	Negativa	25/01/2018	11.6	8.96	28.8	76	45.55
A36 R1	Negativa	25/01/2018	18.6	8.01	25.7	87	52.75
A23 R1	Negativa	25/01/2018	09.9	7.41	26.8	74	44.01
A28 R1	Negativa	25/01/2018	17.0	7.13	25.6	85	52.45
A24 R1	Negativa	25/01/2018	10.1	7.13	25.6	85	44.34
A40 R2	Negativa	25/01/2018	11.4	7.06	25.8	85	43.85
A29 R2	Negativa	25/01/2018	09.2	6.70	23.3	99	41.75
A15 R3	Negativa	25/01/2018	11.8	6.80	26.0	88	43.12
A41	Negativa	26/01/2018	24.8	6.97	26.6	87	58.67
A42	Negativa	26/01/2018	05.2	6.78	27.9	84	36.89
A43	Negativa	26/01/2018	02.3	6.60	26.1	91	23.12
A44	Negativa	26/01/2018	01.3	6.60	26.1	91	22.78
A45	Negativa	31/01/2018	01.8	6.94	26.6	73	23.23
A15 R4	Negativa	31/01/2018	12.7	7.31	25.0	74	44.01
A23 R2	Negativa	31/01/2018	10.4	7.69	25.6	80	45.56
A24 R2	Negativa	31/01/2018	11.4	7.48	24.0	78	43.34
A06 R4	Negativa	31/01/2018	11.6	8.08	23.1	80	44.89
A28 R2	Negativa	31/01/2018	18.2	8.08	23.1	80	51.90
A40 R3	Negativa	31/01/2018	11.4	8.18	24.0	80	43.90
A42 R1	Negativa	31/01/2018	07.1	7.78	27.7	84	37.01
A27 R3	Negativa	08/02/2018	14.4	10.1	29.8	70	59.12
A23 R3	Negativa	08/02/2018	10.2	7.80	28.9	73	44.78
A46	Negativa	08/02/2018	01.6	7.84	27.6	77	22.67
A45 R1	Negativa	08/02/2018	02.0	9.38	25.6	80	25.67
A44 R1	Negativa	08/02/2018	02.9	8.37	24.0	86	28.67
A42 R2	Negativa	08/02/2018	06.8	8.37	24.0	86	37.45
A15 R5	Negativa	08/02/2018	12.0	8.10	25.1	99	44.12
A39 R1	Negativa	08/02/2018	04.4	7.48	24.1	99	34.01
A48	Negativa	08/02/2018	01.4	7.57	25.1	99	22.89
A49	Negativa	08/02/2018	01.8	7.57	25.1	99	24.78
A50	Positiva	08/02/2018	01.9	8.47	23.1	95	25.68
A29 R3	Negativa	08/02/2018	09.4	8.23	24.8	99	42.56
A51	Negativa	08/02/2018	12.4	7.79	24.1	93	44.12
A52	Negativa	08/02/2018	10.6	8.56	24.1	92	42.65
A53	Negativa	08/02/2018	19.4	8.56	24.1	92	51.34

A37 R2	Negativa	08/02/2018	11.1	8.58	24.1	90	43.34
A19 R2	Negativa	08/02/2018	21.3	8.74	24.1	89	53.45
A27 R4	Negativa	24/02/2018	14.1	7.69	24.4	81	49.89
A 54	Negativa	24/02/2018	02.2	8.85	25.0	79	26.11
A55	Negativa	24/02/2018	03.2	7.26	24.7	82	28.45
A56	Negativa	24/02/2018	02.2	6.95	23.1	81	25.89
A57	Negativa	24/02/2018	01.7	7.28	22.0	81	24.89
A15 R6	Negativa	24/02/2018	12.1	7.32	22.0	94	43.01
A58	Negativa	24/02/2018	01.6	7.32	22.0	94	23.09
A24 R3	Negativa	24/02/2018	10.3	7.67	22.4	99	41.23
A23 R4	Negativa	24/02/2018	10.8	7.61	22.4	87	44.78
A59	Negativa	24/02/2018	01.5	7.61	22.4	87	23.01
A60	Negativa	24/02/2018	05.5	7.19	21.0	92	34.90
A61	Negativa	24/02/2018	01.9	7.94	21.0	97	24.34
A52 R1	Negativa	24/02/2018	11.4	8.15	21.0	92	43.01
A44 R2	Negativa	24/02/2018	04.2	7.21	20.1	92	32.01
A62	Negativa	10/03/2018	02.1	7.90	25.4	85	27.80
A40 R4	Negativa	10/03/2018	11.8	8.50	25.1	84	44.10
A15 R7	Negativa	10/03/2018	12.6	8.62	24.4	90	45.50
A60 R1	Negativa	10/03/2018	07.3	8.45	24.4	91	39.60
A63	Negativa	10/03/2018	01.8	8.45	24.4	91	26.60
A44 R2	Negativa	10/03/2018	07.0	8.28	22.0	99	37.70
A64	Negativa	10/03/2018	11.9	8.04	28.0	99	46.10
A65	Negativa	07/04/2018	01.8	7.01	23.0	79	17.70
A66	Negativa	07/04/2018	01.6	7.01	23.0	79	23.20
A67	Negativa	07/04/2018	02.1	8.81	21.0	85	26.90
A69	Negativa	07/04/2018	03.3	6.82	21.1	86	31.80
A70	Negativa	07/04/2018	03.6	7.07	17.1	99	30.80
A71	Negativa	07/04/2018	02.7	7.07	17.0	99	30.20
A72	Negativa	07/04/2018	02.5	6.74	17.0	97	28.90
A73	Negativa	07/04/2018	11.7	7.22	17.0	99	47.10
A74	Negativa	07/04/2018	08.0	6.18	17.0	99	40.80
A75	Negativa	07/04/2018	02.3	6.25	17.0	99	28.70
A76	Negativa	14/07/2018	07.5	8.20	16.9	89	42.5
A77	Negativa	14/07/2018	06.8	8.83	17.1	88	44.7
A78	Negativa	14/07/2018	01.7	9.08	12.7	92	27.3
A80	Negativa	14/07/2018	9.6	8.81	14.5	93	47.5
A81	Negativa	14/07/2018	3.7	9.34	15.9	87	35.1
A82	Positiva	14/07/2018	6.8	8.49	13.8	90	42.3
A77 R1	Negativa	28/07/2018	10.1	6.67	19.9	78	43.3
A83	Negativa	28/07/2018	4.7	6.67	19.9	78	32.0
A84	Positiva	28/07/2018	7.6	6.69	16.9	90	43.0
A76 R1	Negativa	28/07/2018	10.5	6.63	17.4	92	46.2
A78 R1	Negativa	28/07/2018	2.9	6.86	17.7	91	28.5

A80 R1	Negativa	28/07/2018	18.2	6.52	16.2	92	47.3
A85	Negativa	28/07/2018	1.8	6.31	16.2	94	25.8
A86	Positiva	04/08/2018	5.5	6.40	18.3	87	36.0
A76 R2	Positiva	04/08/2018	11.0	6.40	18.7	91	43.9
A77 R2	Positiva	18/08/2018	10.4	7.24	16.2	85	42.9
A84 R1	Positiva	18/08/2018	8.1	7.90	13.3	88	38.9
A76 R3	Positiva	18/08/2018	11.2	7.74	12.9	92	44.2
A87	Negativa	18/08/2018	2.6	8.16	13.8	95	28.3
A88	Negativa	18/08/2018	9.0	7.99	13.5	93	41.3
A89	Negativa	18/08/2018	1.9	7.95	14.1	95	25.2
A90	Positiva	18/08/2018	10.6	7.77	13.6	97	43.0
A91	Negativa	07/09/2018	2.1	7.29	15.6	70	25.0
A77 R3	Positiva	07/09/2018	10.9	7.29	15.6	70	44.1
A83 R1	Negativa	07/09/2018	5.9	7.29	15.6	70	36.1
A92	Positiva	07/09/2018	19.3	7.12	13.8	86	52.4
A76 R3	Positiva	07/09/2018	11.1	7.87	13.3	91	44.5
A94	Positiva	07/09/2018	2.1	7.23	13.9	88	27.0
A84 R2	Positiva	07/09/2018	8.5	7.63	14.2	93	41.1
A93	Positiva	07/09/2018	8.8	7.63	14.2	93	40.3
A95	Positiva	07/09/2018	2.8	8.52	12.1	93	29.3
A96	Negativa	07/09/2018	4.3	6.95	11.9	95	33.1
A97	Negativa	07/09/2018	2.1	7.34	12.3	95	25.9
A77 R4	Positiva	15/09/2018	10.4	7.51	17.0	76	43.1
A91 R1	Negativa	15/09/2018	2.6	7.49	16.0	77	26.9
U12	Positiva	15/09/2018	2.9	8.11	15.7	80	28.6
A83 R2	Negativa	15/09/2018	6.0	7.38	15.1	82	37.9
A99	Positiva	15/09/2018	2.1	7.41	15.3	85	26.4
U00	Negativa	15/09/2018	2.5	7.82	15.1	86	28.5
U01	Negativa	15/09/2018	1.8	7.85	15.9	87	25.2
U02	Negativa	15/09/2018	3.0	8.07	15.6	88	29.3
U03	Negativa	15/09/2018	4.4	8.07	15.6	88	32.1
A93 R1	Positiva	15/09/2018	9.1	7.84	15.6	88	41.7
U04	Negativa	15/09/2018	3.0	8.07	16.7	89	28.3
A87 R1	Negativa	15/09/2018	4.4	8.90	15.1	89	33.9
U05	Negativa	15/09/2018	2.5	9.12	14.4	89	27.2
A95 R1	Negativa	15/09/2018	3.4	9.12	14.4	89	32.1
U06	Negativa	15/09/2018	2.0	8.44	14.4	91	27.1
A96 R1	Positiva	15/09/2018	5.0	8.25	14.3	93	32.6
A84 R3	Positiva	22/09/2018	9.0	7.18	24.9	73	40.8
U08	Negativa	22/09/2018	2.1	7.13	22.3	80	26.7
U09	Negativa	29/09/2018	2.7	7.96	24.0	66	28.3
A77 R5	Negativa	29/09/2018	9.9	7.17	23.2	72	42.6
U10	Negativa	29/09/2018	1.9	7.63	23.0	80	26.2
U11	Negativa	29/09/2018	2.1	8.31	22.7	84	27.1

U12 R1	Positiva	29/09/2018	4.1	8.31	22.7	84	32.9
U13	Negativa	29/09/2018	6.6	8.42	21.6	89	37.2
U14	Negativa	29/09/2018	3.0	9.49	21.9	93	28.7
A87 R2	Negativa	29/09/2018	6.0	9.49	21.9	93	36.1
A93 R2	Negativa	29/09/2018	9.3	8.93	22.0	91	41.8
A96 R2	Negativa	29/09/2018	6.1	8.93	22.2	92	36.3
A76 R4	Negativa	29/09/2018	11.3	9.34	22.2	92	44.8
A84 R4	Positiva	29/09/2018	9.2	9.14	22.1	91	41.5

Fonte: autora.