

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

JESSICA DE LARA JEZIORNY

ANÁLISE MICRO ESPACIAL SOBRE A INCIDÊNCIA DE FUNGO QUITRÍDIO
EM ADULTOS DE *Crossodactylus schmidtii*, GALLARDO, 1961 (ANURA,
HYLODIDAE)

FRANCISCO BELTRÃO/PR

2019

JESSICA DE LARA JEZIORNY

ANÁLISE MICRO ESPACIAL SOBRE A INCIDÊNCIA DE FUNGO QUITRÍDIO
EM ADULTOS DE *Crossodactylus schmidtii*, GALLARDO, 1961 (ANURA,
HYLODIDAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Ambiental, do Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Ambiental,
Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Linha de Pesquisa: Análise Ambiental
Orientador(a): Prof(a). Dra. Michelle Milanez
França
Co-orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Lingnau

FRANCISCO BELTRÃO/PR

2019

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

J59a	<p>Jeziorny, Jessica de Lara Análise micro espacial sobre a incidência de fungo quitrídio em adultos de <i>Crossodactylus schmidtii</i>, Gallardo, 1961 (Anura, Hylodidae) / Jessica de Lara Jeziorny. – Francisco Beltrão: [s.n.], 2019. 35 f.: il.</p> <p>Orientador: Prof(a). Dra. Michelle Milanez França Coorientadora: Prof. Dr. Rodrigo Lingnau Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Francisco Beltrão, 2019. Bibliografia: f. 28-35</p> <p>1. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>. 2. Fungos patogênicos. 3. Bactérias patogênicas. 4. Anfíbios I. França, Michelle Milanez, orient. II. Lingnau, Rodrigo, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Título.</p> <p>CDD: 628</p>
------	--



FOLHA DE APROVAÇÃO Nº 011

**ANÁLISE MICRO ESPACIAL SOBRE A INCIDÊNCIA DE FUNGO QUITRÍDIO EM
ADULTOS DE *CROSSODACTYLUS SCHMIDTI*.**

por

Jéssica de Lara Jeziorny

Esta dissertação foi apresentada às catorze horas do dia dezesseis de setembro de dois mil e dezenove como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL, com área de concentração em Meio Ambiente, linha de pesquisa em Tecnologia Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. O (a) candidato (a) foi arguido (a) pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Lucas Gonsales - UFSM
Membro externo

Prof. Dr. Rodrigo Lingnau – UTFPR
Orientador (a)

Prof. Dr. Fernando Cesar Manosso– UTFPR
Membro

Prof. Dr. Rodrigo Lingnau – UTFPR
Coordenador

**A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NA COORDENAÇÃO DO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL: ANÁLISE E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

RESUMO

As populações de anfíbios de todo o mundo encontram-se sob sérios riscos, as doenças emergentes como a quitridiomicose, são preocupantes ameaças à biodiversidade de anfíbios da atualidade. Avaliar a ocorrência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) em adultos de *Crossodactylus schmidti* e a influência da sazonalidade no processo infeccioso são os objetivos do presente trabalho. As amostragens foram realizadas em quatro riachos no Parque Nacional do Iguaçu (PNI). Cada riacho foi amostrado duas vezes por estação do ano, entre Janeiro e Outubro de 2018. A incidência e a prevalência da infecção por *Bd* pode ser modificada por fatores ambientais e estruturais dos habitats, onde os hospedeiros estão inseridos. Com a intenção de verificar a relação das características ambientais e estruturais do habitat, com a incidência e intensidade do *Bd*, a cada coleta foram mensuradas: a temperatura da água e do ar, o pH, a cobertura de dossel, a velocidade da água, a largura e a profundidade dos riachos, bem como o comprimento rostro cloacal (CRC) dos adultos de *C. schmidti*. Foram encontrados adultos em todos os riachos amostrados, sem nenhum registro de indivíduos mortos, totalizando 119 animais. Durante a estação fria, 50,94% dos indivíduos amostrados estavam infectados pelo fungo, e durante a estação quente, esse percentual foi de 33,33%. Os resultados encontrados referentes a temperatura média, pH e cobertura de dossel indicam que o ambiente estudado apresenta condições favoráveis para a ocorrência do *Bd*, no entanto, nenhuma das variáveis abióticas mensuradas foi estatisticamente significativa para a ocorrência do fungo, que foi efetivamente constatada nos quatro riachos avaliados. A sazonalidade se mostrou importante para a incidência de infecção, e foi maior durante as estações mais frias ($n = 119$; $Z = -2,19$; $P = 0,028$) e entre os indivíduos menores da população ($N = 119$; $Z = -2,75$; $P = 0,005$). Ainda que os adultos permaneçam assintomáticos, as consequências sub letais da exposição a quitridiomicose deve ser constantemente monitoradas no interior do Parque Nacional do Iguaçu, a fim de preservar as populações de anfíbios ali inseridas.

PALAVRAS-CHAVE: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Anfíbios. Conservação. Doenças Infecciosas.

ABSTRACT

Amphibian populations around the world detect serious risks, such as emerging diseases such as chytridiomycosis; they are of concern to today's amphibian biodiversity. To consider an occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) fungus in adults of *Crossodactylus schmidti* and an influence of seasonality on the infectious process are the objectives of the present work. Samples were taken from four streams in the Iguassu National Park (PNI). Each stream was sampled twice per season between January and October 2018. The incidence and prevalence of *Bd* infection can be modified by environmental factors and the statistics of the habitats in which the hosts are located. With the intention of verifying the relation of the environmental resources and selecting the habitat, with the incidence and intensity of the *Bd*, a set of measures were measured: the water and air temperature, the pH, the water coverage, the speed of the water, the width and depth of the streams as well as the cloacal rostrum length (CRC) of the *C. schmidti* adults. Were found adults in all streams sampled, with no record of dead deaths, totaling 119 animals. During the cold season, the fungus infected 50.94% of the samples collected and during the warm season, this percentage was 33.33%. The results found related to the average temperature, pH and sample selection coverage that the studied environment presents favorable conditions for the occurrence of *Bd*, however, none of the abiotic variables measured was statistically significant for the presence of the fungus. Was actually found in the four streams. Seasonality proved to be important for the incidence of infection, and was higher during the colder seasons ($n = 119$; $Z = - 2.19$; $P = 0.028$) and among the smaller population ($N = 119$; $Z =$ Although adults remain asymptomatic, the sublethal consequences of exposure to chytridiomycosis must be constantly monitored within the Iguacu National Park in order to preserve the amphibian populations inserted there.

KEY WORDS: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Amphibians. Conservation. Infectious Diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	13
Figura 2 - Mapa da área de estudo.....	18
Figura 3 – Acomodação dos espécimes em campo	19
Figura 4 – Efeito da variação da temperatura do ar e do comprimento rostro cloacal em relação a presença do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	21
Figura 5 – Variação sazonal da temperatura do ar	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores médios de incidência e prevalência de infecção por estação.....	22
TABELA 2 - Valores médios das variáveis ambientais e estruturais dos riachos	22
TABELA 3 – Modelos.....	23
TABELA 4 – Efeitos específicos das variáveis constituintes dos modelos.....	23
TABELA 5 - Resultados parciais da regressão linear múltipla	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Principais ameaças aos anfíbios	10
1.2 Fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	12
1.3 Espécie modelo de estudo	16
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Área de estudo	17
3.2 Delineamento amostral	18
3.3 Análises estatísticas	20
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Principais ameaças aos anfíbios:

Os primeiros dados referentes ao declínio da riqueza de espécies de anfíbios são da década de 1970 (Sherman & Morton, 1993). Desde a publicação dos primeiros artigos relacionados ao tema, muito tem sido debatido quanto às prováveis causas dos referidos declínios. De forma exaustiva, muitos pesquisadores ao longo de décadas, tem demonstrado através de seus trabalhos, que a destruição e perda do habitat (Cushman, 2006), as mudanças climáticas (Thomas et al. 2004), a radiação UV – B (Weyrauch e Grubb, 2006), os contaminantes químicos (Hayes et al. 2002) e as doenças (Robert, 2010) são as principais causas das extinções e declínios populacionais de anfíbios. Todos esses fatores, colocaram os anfíbios no topo de uma lista pouco desejada, a frente do grupo das aves e dos mamíferos, lideram o *rank* das espécies ameaçadas no mundo (Robert, 2010). O estado de conservação dos anfíbios, se tornou ainda mais preocupante, quando em 1980 os declínios populacionais passaram a ser recorrentemente registrados em habitats bem preservados (Becker & Zamudio, 2011). Os declínios e o fato de ocorrerem em habitats pouco impactados sugeriam uma possível relação com doenças infecciosas (Daszak et al. 1999; Young et al. 2001).

As doenças infecciosas emergentes, são aquelas que uma vez dentro de uma população ou comunidade, aumentam significativamente em um curto período de tempo, em incidência, virulência e abrangência de hospedeiros (Daszak et al. 2000). A diversidade de patógenos é positivamente relacionada com a diversidade de hospedeiros potenciais (Ostfeld & Keesing, 2012), o que faz da região tropical um cenário propício para uma alta probabilidade de emergência de patógenos (Jones et al. 2008). Uma grande variedade de patógenos podem acometer as populações de anfíbios nos ambientes naturais, e podem infectar os indivíduos tanto na fase larval como na fase adulta (Berger et al. 1998; Kilpatrick et al. 2009). Os patógenos podem ser de origem bacteriana, parasitária, viral ou fúngica. Os efeitos dessas patologias sob as populações vão de interferências ao desenvolvimento a mortalidade em massa, comprometendo de forma direta a viabilidade das comunidades (Blaustein & Kiesecker, 2002).

As doenças bacterianas que acometem anfíbios, são oriundas majoritariamente de organismos gram negativos, incluindo as *Aeromonas* e *Pseudomonas* sp (Pessier, 2007). As doenças de origem bacteriana são mais frequentemente registradas em animais de cativeiro, embora possam ser encontradas em menor frequência em animais de vida livre. Uma das doenças bacterianas mais preocupantes para os anfíbios é a clamidiose,

essa patologia causada pela gênero *Chlamydia*, de hábito intracelular obrigatório (Harkinezhad et al. 2009) pode causar alterações no comportamento do hospedeiro, além de comprometer o estado nutricional dos indivíduos infectados, podendo ser letal (Berger et al. 1998). As espécies do gênero podem causar variadas patologias, causando prejuízos por exemplo, às funções pulmonares e hepáticas (Berger et al. 1998; Reed et al. 2000).

Anfíbios são altamente parasitados por uma diversidade de organismos, que podem apresentar tanto um ciclo de vida direto, que requer um único hospedeiro para completar sua metamorfose, como ciclos de vida mais complexos, que requerem mais de um hospedeiro, podendo ser os anfíbios, nesse último caso, tanto o hospedeiro definitivo, como o hospedeiro intermediário (Poynton & Whitaker, 2001; Lunaschi & Drago, 2007). Entre os parasitas de anfíbios, os helmintos pertencentes as classes Nematoda, Trematoda e Cestoda são os mais recorrentemente estudados (Holmes et al. 2008; Campião et al. 2009). No casos de hospedeiros intermediários, os anfíbios podem ser infectados enquanto forrageiam, como acontece por exemplo, na infecção por metacercárias (Hamann, 2006). Já as infecções por parasitas que utilizam os anfíbios como hospedeiros definitivos, ocorrem geralmente através da penetração cutânea, onde, a forma pós metamórfica do parasita entra em contato com a pele do hospedeiro. O parasita utiliza o interior do hospedeiro para a reprodução e deposição de seus ovos ou mudas, após a maturação dos estados juvenis dos parasitas eles são então expulsos do hospedeiro por via oral ou anal, podendo ou não ocasionar a morte dos indivíduos parasitados (Hamann, 2006). Os sinais clínicos do parasitismo por helmintos em anfíbios incluem: má formação e redução do tamanho corporal dos adultos, quando a infecção ocorre ainda nos estágios larvais (Johnson et al. 2002), além de variadas alterações nas funções musculares, cardíacas, pulmonares, hepáticas e na visão do hospedeiro (Wright, 2006).

As patologias virais são importantes ameaças às populações de anfíbios em todo o globo terrestre, o ranavírus por exemplo, está diretamente relacionado a declínios em massa de populações selvagens e de cativeiro, não sendo uma patologia restrita aos anfíbios, mas que também atinge répteis e peixes (Chinchar, 2002; Chinchar, 2009; Driskell et al. 2009). O ranavírus possui muitas especificidades, entre elas, a capacidade de se reproduzir tanto no núcleo quanto no citoplasma das células que infecta (Granoff, 1984). Outra particularidade do ranavírus, é que o envelope que envolve o vírus não é indispensável, ou seja, mesmo as partículas liberadas durante a lise celular são infecciosas (Robert, 2010), o que justifica a abrangência de infecção e os prejuízos ocasionados por essa patologia às populações de anfíbios. Os sinais clínicos da ranavirose incluem:

edemas nas cavidades corporais, coloração pálida, hemorragia sistêmica, e manchas avermelhadas na pele (Greer et al. 2005). No entanto a infecção por ranavírus pode ser assintomática (Driskell et al. 2009), sendo percebida somente pela mortalidade em massa que deixa como rastro por onde passa.

As doenças fúngicas possuem registro de incidência no território brasileiro desde a década de 30 (Carvalho et al. 2017). Apesar disso, somente em 1998 as patologias micóticas começaram a despertar o interesse da comunidade científica (Berger, 1998). Entre as doenças fúngicas, merecem destaque as micoses, esse tipo de patologia está associado a episódios de estresse, traumas ou algum outro tipo de evento preditor da imunodepressão (Taylor et al. 1999). Uma importante patologia de origem micótica da atualidade é a quitridiomiose, essa enfermidade causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) tem sido associada a declínios em centenas de anfíbios no mundo (Skerratt et al. 2007).

1.2 Fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*:

Declínios enigmáticos inicialmente associados a eventos climáticos e as alterações na qualidade e na disponibilidade de habitats foram registrados no Brasil durante a década de 80 (Heyer et al. 1988; Weygoldt, 1989). Os declínios frequentes em áreas bem preservadas sugeriam uma possível relação com doenças infecciosas (Daszak et al. 1999; Young et al. 2001). O fungo cutâneo *Batrachochytrium dendrobatidis* foi inicialmente estudado em indivíduos encontrados mortos ou moribundos, juntamente com grande parte da população na qual estavam inseridos. Essas mortalidades em grande escala, passaram a ser observadas no ambiente natural de 1993 a 1998 no continente australiano e norte americano (Berger, 1998). Após pouco mais de duas décadas de estudos, muitos avanços foram obtidos em relação a compreensão dos mecanismos de ação e da história de vida desse fungo, tão preocupante para a conservação de anfíbios.

O *Bd*, hoje apresenta distribuição cosmopolita (Daszak et al. 2003; Skerratt et al. 2007) e sabe-se que possui diferentes linhagens, *Bd*GPL (global), *Bd*CAPE (africana), *Bd*CH (europeia), *Bd*KOREA (asiática) e *Bd*BRAZIL (brasileira) (Rosenblum et al. 2013). De acordo com O'Hanlon et al. (2018) o *Bd* teria surgido na Ásia e então se dispersado para os demais continentes do globo, e ainda, que essa dispersão teria sido facilitada por atividades antrópicas.

O fungo apresenta dois estágios de vida: um sésil e outro móvel (Kilpatrick et al. 2009). Um zoósporo sésil se desenvolve em um talo também sésil, que origina um

único zoosporângio, que nada mais é do que uma estrutura reprodutiva, responsável pela produção dos zoósporos, que compõe o segundo estágio de vida do *Bd*. A motilidade nesse estágio de vida é fornecida por um único flagelo, através do qual o zoósporo pode se locomover por até 24 horas dentro da água (Berger et al. 2005; Kilpatrick et al. 2009). Findado o período de motilidade e dispersão, já em contato com o hospedeiro, o flagelo é reabsorvido e o zoósporo encista (Berger et al. 2005) (Figura 1). A fase seguinte conta com o crescimento dos rizoides que podem partir de uma ou de múltiplas extremidades. O talo inicia então o seu desenvolvimento, e após um período de quatro a cinco dias, torna-se multinucleado, através de divisões mitóticas, o conteúdo do interior do talo é então clivado em zoósporos maduros aptos a serem dispersos no ambiente através de um tubo de descarga, para dar início a um novo processo de infecção (Longcore et al. 1999; Berger et al. 2005). A reprodução sexuada ainda é pouco entendida, no entanto, sabe-se que ocorre, pois existem linhagens híbridas que evidenciam que ao menos duas linhagens (*Bd*GPL e a *Bd*BRAZIL) podem se reproduzir de forma sexuada (Ghosh & Fisher, 2016).

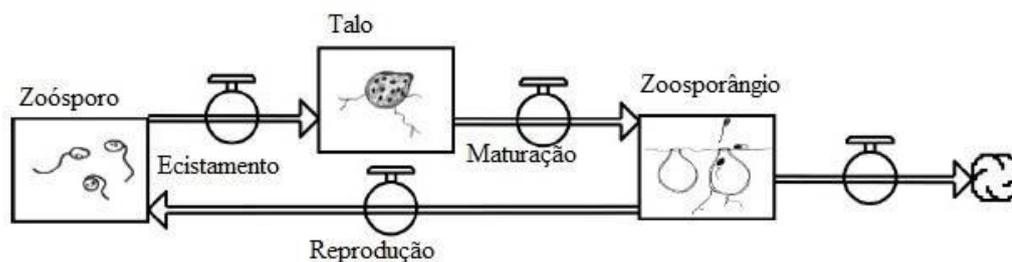


Figura 1. Ciclo de vida do *Batrachochytrium dendrobatidis*, o esquema mostra os três estágios de vida do fungo (Zoósporo, Talo e Zoosporângio) bem como os processos que antecedem cada fase do ciclo de vida, a reprodução, o encistamento e a maturação. Fonte: (Woodhams et al. 2008)

Após a infecção, o hospedeiro pode ou não exibir os sinais clínicos da doença (McDonald et al. 2005). Quando o hospedeiro permanece assintomático, ele pode desempenhar a função de depósito, auxiliando na permanência dos zoósporos no meio ambiente, uma vez que o hospedeiro infectado pode servir de substrato para muitas gerações do patógeno, culminando com a sua morte ou não (Hanselmann et al. 2004; Rachwicz & Vredenburg, 2004; Raffel et al. 2010; Narayan et al. 2014). Quando exibe os sintomas característicos da quitridiomiose, que podem ser expressados entre cinco a quinze dias após a exposição, os indivíduos adultos podem apresentar postura anormal, pernas posicionadas acima do corpo, ventre elevado em relação ao substrato, letargia, perda de reflexo, desprendimento epidérmico anormal, ulcerações, hemorragias (pele, olhos ou músculos), hiperemia da pele e finalmente a morte (Daszak et al. 1999;

Baitchman e Pessier, 2013 e Mutschmann, 2015). Nos girinos, é possível observar alterações nos discos orais, como por exemplo, má formação e despigmentação (Berger et al. 1998). Tendo colonizado o hospedeiro, os zoósporos passam a interferir na capacidade osmorregulatória dos indivíduos, dificultando as funções metabólicas e o balanço de íons, além de causar alterações nos canais de eletrólitos, desequilíbrios eletrolíticos, alterações no pH sanguíneo e degradação das estruturas queratinizadas que incluem as estruturas bucais em girinos, e a pele nos adultos (Wright & Whitaker, 2001; Voyles et al. 2009; Baitchman & Pessier, 2013).

A incidência e a prevalência da infecção por *Bd* pode ser modificada por fatores ambientais e estruturais dos habitats onde os hospedeiros estão inseridos (Becker & Zamudio, 2011). Sabe-se que determinadas condições como o pH, a temperatura, a cobertura de dossel bem como as características estruturais dos riachos interferem na incidência e prevalência do *Bd* em ambientes naturais (Woodhams et al. 2008; Kilpatrick et al. 2009; Becker et al. 2012). Experimentalmente, tem-se demonstrado que o *Bd* pode sobreviver por até três meses fora do hospedeiro (Johnson & Speare, 2005), o que torna importantes as informações, referentes as condições mínimas necessárias para a atividade do fungo.

Sabe-se que os zoósporos podem crescer e se reproduzir experimentalmente sob temperaturas que variam de 4°C a 25°C, apresentando a taxa de crescimento ótimo entre 17°C e 25°C (Piotrowski et al. 2004; Gleason et al. 2008; Kilpatrick et al. 2009). Embora o *Bd* apresente uma alta patogenicidade em uma ampla gama de temperaturas, a exposição ao frio, assim como a variabilidade sazonal favorecem a aptidão do fungo sob baixas temperaturas (Woodhams et al. 2008). Logo, a atividade do fungo e a consequente infestação, são maiores durante as estações mais frias (Ruggeri et al. 2015), possivelmente devido a uma depressão do sistema imunológico dos hospedeiros frente a baixas temperaturas (Raffel et al. 2006; Ruggeri et al. 2015).

Florestas intocadas apresentam uma maior incidência de *Bd* do que ambientes perturbados (Becker & Zamudio, 2011). A intensidade de infecção ao hospedeiro também é mais alta em ambientes não impactados. Uma das possíveis explicações para esse padrão é que a remoção da cobertura de dossel original dos ambientes florestais, reduz a complexidade da vegetação, tanto da cobertura como da vegetação aquática, alterando o microclima da localidade (Becker et al. 2012). Essa alteração nas condições, reflete na composição das comunidades de hospedeiros potenciais, bem como na temperatura local,

que são fatores importantes para a dinâmica das populações de *Bd* (Wikelski & Cooke, 2006; Navas & Otani, 2007; Becker et al. 2012).

O pH também é um fator limitante para a proliferação do fungo. Estudos tem demonstrado que as condições ótimas para o crescimento e reprodução do *Bd* estão entre pH 6 – 7,5 (Johnson & Speare, 2005). Apesar de apresentar alguma atividade em pH mais alcalino (8 – 10), é possível observar um decréscimo acentuando no crescimento do patógenos, quando exposto a essa condição (Gleason et al. 2005; Woodhams et al. 2007).

A exemplo das condições, as características estruturais dos habitats se mostram significativas para a prevalência dos zoósporos de *Bd* nos ambientes florestais (Valencia – Aguilar et al. 2016). Largura e profundidade são medidas de volume que refletem a área do habitat disponível. Segundo Valencia – Aguilar et al. (2016) a densidade de hospedeiros é inversamente proporcional ao aumento da profundidade, provavelmente devido a uma relação negativa com a temperatura (Sparling, 2010). No entanto, as temperaturas mais baixas são favoráveis ao desenvolvimento do *Bd*. Quanto maior a área disponível, menor será a agregação dos potenciais hospedeiros, resultando em uma menor chance de contágios intra e interespecífico (Valencia – Aguilar et al. 2016), ou seja, habitats menores são mais favoráveis a dispersão do patógeno. Um fluxo mais rápido pode dificultar o contato e consequente infecção do fungo com os potenciais hospedeiros, uma vez que a velocidade tende a interferir na motilidade dos zoósporos (Valencia – Aguilar et al. 2016). Um padrão positivo entre o aumento da prevalência da infestação e a redução da intensidade do fluxo de água nos riachos durante a estação seca já foi documentado em riachos na África do Sul e no Peru (Conradie et al. 2011; Catenazzi et al. 2013).

Os patógenos podem interferir em aspectos variados da ecologia de seus hospedeiros, como por exemplo: a reprodução e o desenvolvimento (Kiesecker & Skelly, 2001). Anuros expostos ao *Bd* na fase larval tiveram o crescimento comprometido na fase adulta em experimentos realizados em laboratório em comparação a indivíduos mantidos sob as mesmas condições, exceto pela exposição ao fungo (Davidson et al. 2007; Venesky et al. 2010). De acordo com Connors & Nickol (1999) a energia que seria gasta nas atividades referentes a alimentação e ao metabolismo, pode ser realocada para o sistema imunológico, resultando em um desenvolvimento e crescimento reduzido dos indivíduos.

As patologias são importantes determinantes para o estado de conservação e a manutenção das populações silvestres (Robert, 2010). Apesar de serem responsáveis por muitos declínios ou mesmo extinções, em alguns casos, os hospedeiros podem seguir

infectados sem expressar os sinais clínicos das doença pelas quais são acometidos (Retallick et al. 2004) por vezes, indivíduos de uma mesma população se mostram mais suscetíveis a infecção, enquanto outros são tolerantes ou mesmo resistentes a um ou outro patógeno. As defesas imunitárias dos anfíbios para os patógenos ainda são mal definidas e pouco estudadas (Robert, 2010), o que tornam importantes as investigações em áreas preservadas, mesmo que não existam relatos de mortalidade.

1.3 Espécie modelo de estudo:

A família Hylodidae é constituída por espécies de rãs comumente encontradas em riachos de interior de mata, de hábitos predominantemente diurnos (Jordão - Nogueira et al, 2006) é composta por 47 espécies de três gêneros: *Hylodes* com 26 espécies, *Crossodactylus* com 14 espécies e *Megaelosia* com sete espécies (Frost, 2019). O gênero *Crossodactylus* é o segundo maior gênero da família Hylodidae, e sua distribuição geográfica abrange o sul do Brasil, sul do Paraguai e norte da Argentina (Frost, 2019; Caldart et al. 2010, Lucas e Garcia 2011). *Crossodactylus schmidti* é uma espécie que tem sua população considerada em estado de decréscimo, e atualmente é considerada quase ameaçada a nível global (IUCN, 2019) e a nível nacional no Brasil (ICMBIO, 2016). Apesar da distribuição geográfica relativamente ampla, as populações são muito fragmentadas e altamente associadas a região sul da mata atlântica (Bastiani et al. 2012), e foi a espécie utilizada como modelo para o presente estudo. Os adultos são comumente encontrados em riachos de pequeno a médio porte, com substrato majoritariamente rochoso, com encostas arborizadas e por vezes sendo cortados por pequenas cachoeiras (Bastiani et al. 2012).

A associação das populações de *C. schmidti* com ambientes bem preservados, e com a Mata Atlântica, evidenciam a urgência de estudos para a compreensão dos aspectos ecológicos dessas fragmentadas populações bem como, os agravantes que colocam em risco a permanência dessa espécie, que ocorre em habitats tão sensíveis e cada vez mais pressionados por ações antrópicas (Kauano et al. 2012). O *Bd* tem sido relacionado a declínios populacionais e extinções de espécies de anfíbios em todo o mundo (Skerratt et al. 2007; Wake e Vredenburg, 2008). Tornando-se, portanto, uma ameaça de grandes proporções para as comunidades de anfíbios.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo geral avaliar a ocorrência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em adultos de *Crossodactylus schmidti* em relação à sazonalidade no processo infeccioso na escala micro espacial. Para tanto, buscamos responder as seguintes perguntas:

2.2 Objetivos específicos

- 1) compreender se a incidência do fungo *Bd* está positivamente relacionada às variáveis ambientais mensuradas (cobertura de dossel, velocidade da água, profundidade do riacho, pH).
- 2) verificar se a prevalência de infestação por *Bd* é diferente ao longo das estações do ano.
- 3) observar a existência de uma tendência de indivíduos infectados apresentar comprimento rostro cloacal (CRC) menor do que indivíduos não infectados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no Parque Nacional do Iguaçu (PNI), uma unidade de conservação de proteção integral, localizada na região oeste do Estado do Paraná (25°05' a 25°41'S, 53°40' a 54°38'O) (IBAMA, 1999) (Figura 2). Com uma área de 185.262,5 hectares, o PNI se estende ao longo de cinco municípios: Céu Azul, Foz do Iguaçu, Matelândia, São Miguel do Iguaçu e Serranópolis do Iguaçu e é margeado por outros seis municípios: Capanema, Capitão Leônidas Marques, Lindoeste, Santa Lúcia, Santa Tereza do Oeste e Santa Terezinha de Itaipu. A cobertura vegetal é composta por Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Mista e Formações Pioneiras Aluviais (IBAMA, 1999). O PNI está localizado em uma região de transição entre os climas tropical e temperado, sendo as estações bem marcadas, na qual o inverno é seco, e o período chuvoso abrange parte do outono e do verão (IBAMA, 1999). A temperatura média anual varia de 18° C a 25° C e a precipitação anual varia de 1501 mm a 1750 mm (Mendonça & Oliveira, 2007).

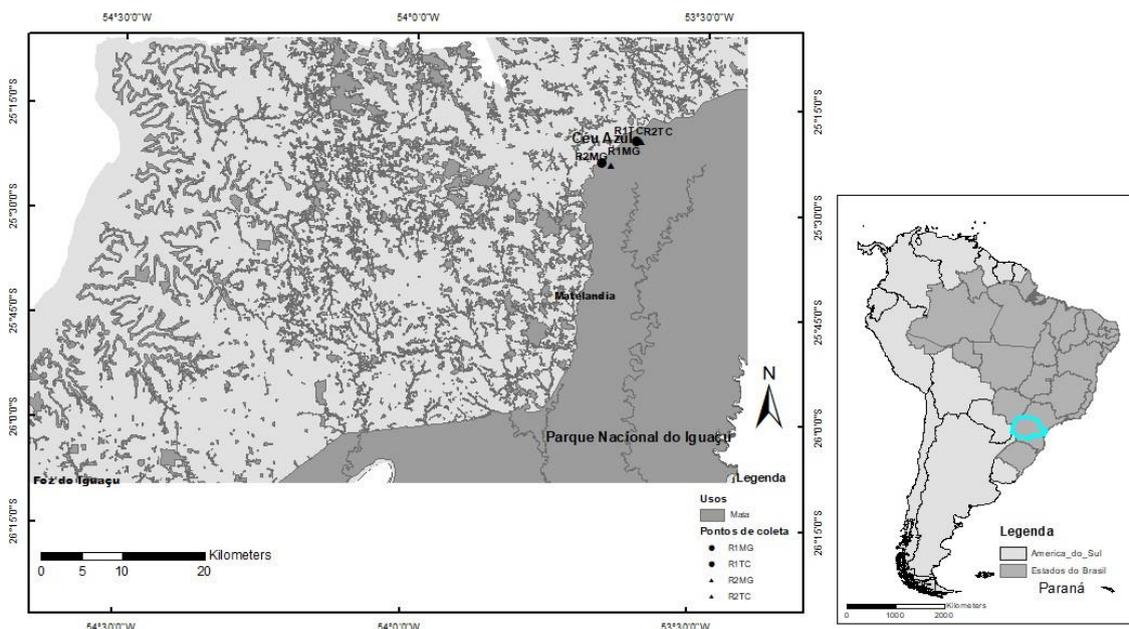


Figura 2. Área de estudo mostrando a localização do Parque Nacional do Iguaçu dentro do Estado do Paraná. No detalhe, os triângulos pretos representam a localização dos riachos amostrados.

3.2 Delineamento amostral

Dentro do PNI, foram amostrados quatro riachos independentes quanto ao seu fluxo, dos quais, dois estão localizados ao longo da trilha Manoel Gomes e dois localizados ao longo da trilha da Boa Vista (Figura 2). Os trabalhos de campo foram realizados de Janeiro a Novembro de 2018. As amostragens ocorreram duas vezes por estação do ano (verão, primavera, outono e inverno) em cada um dos quatro riachos utilizados para a obtenção dos dados, o que possibilitou um total de oito amostragens.

Dentro de cada riacho a mesma dinâmica de busca foi utilizada: a partir do ponto mais a jusante, a busca ativa era iniciada e quando um indivíduo adulto era observado, eles eram capturados e acondicionados, individualmente, com uso de luvas plásticas descartáveis, em sacos plásticos umedecidos, (Figura 3) objetivando sempre capturar o máximo de indivíduos por coleta, no período de 40 minutos. Para cada indivíduo a ser coletado era utilizado um novo par de luvas, para evitar contaminação cruzada do fungo. Do local onde os adultos eram capturados, foram extraídas as variáveis ambientais, de modo que cada indivíduo possui um conjunto de variáveis ambientais do micro-habitat no qual ele foi inicialmente observado. Ao todo foram mensuradas seis variáveis ambientais: profundidade do riacho, largura do riacho, cobertura de dossel, velocidade da água, temperatura da água e pH. A profundidade e a largura foram mensuradas em

centímetros através do uso de uma trena. A cobertura de dossel foi estimada através do uso de fotografias tiradas de forma vertical de baixo para cima, de uma altura padronizada. As imagens obtidas foram analisadas posteriormente pelo *software image J*. A velocidade foi estimada utilizando uma bola de isopor de dois centímetros de diâmetro, sendo avaliado o tempo que a bola de isopor demora para percorrer o trajeto de um metro. A temperatura da água foi mensurada através de um termo – higrômetro. E o pH foi obtido pelo uso de um pHmetro.



Figura 3. Indivíduos capturados e acondicionados de forma individual dentro de sacos plásticos, até o término do período de busca ativa dentro de cada riacho.

Ao final do período de cada coleta, os indivíduos adultos capturados foram mensurados quanto ao comprimento rostro – cloacal (CRC) através do uso de um paquímetro. Posteriormente, através da técnica do *swabbing*, um *swab* estéril (haste flexível envolta em algodão em suas extremidades) foi colocado em contato cinco vezes com a região inguinal direita, cinco vezes com a região inguinal esquerda, cinco vezes com as membranas interdigitais dos membros inferiores e superiores direito e esquerdo de cada indivíduo (Hyatt et al., 2007 e Lambertini et al., 2013). Os *swabs* foram então acondicionados em micro tubos plásticos e posteriormente armazenados sob refrigeração.

Em cada ponto de coleta os indivíduos capturados, após as mensurações foram devolvidos ao ambiente de origem, salvo um exemplar da espécie estudada correspondente a cada riacho, que estão depositados na coleção herpetológica da UTFPR

– Francisco Beltrão, afim de serem usados como testemunhos para o presente trabalho e para estudos futuros.

3.3 Análises Estatísticas

A fim de analisar o conjunto de dados obtido, foram utilizadas as análises de regressão logística linear e regressão logística múltipla. O modelo logístico é recomendado quando a variável resposta é quantitativa, ou representa uma mistura de variáveis e dados qualitativos (Legender & Legender, 2012). Ou seja, para ser um bom preditor, os dados utilizados no modelo logístico devem ser de natureza dicotômica ou binária para as variáveis independentes (variáveis ambientais) e categóricas ou não para as variáveis dependentes (presença de *Bd* e *Bd Load*) (Figueira, 2006; Legender & Legender, 2012).

A fim de relacionar as variáveis respostas (presença de *Bd* e *Bd load*) com os fatores abióticos foi necessária a compreensão do padrão de distribuição bem como a dependência de fatores externos à hipótese apresentada, especificamente o tamanho do corpo (CRC). Para testar o efeito da temperatura do ar sobre a presença de *Bd* (variável de distribuição binomial) foi realizada uma regressão logística múltipla, pois também consideramos um possível efeito do CRC. Como *Bd load* apresentou valores altamente discrepantes e a presença só é determinada com valores de equivalentes genômicos acima de 1, foi realizada a transformação logarítmica (\log_{10}) dessa variável que posteriormente foi relacionada com o fator externo “tamanho do corpo (CRC)” através de uma regressão linear simples. Como trata-se de variáveis correlacionadas os resíduos dessa regressão foram salvos para usá-los na análise subsequente da comparação de intensidade entre as estações.

Para analisar o efeito das variáveis abióticas locais sobre a presença do patógeno nos hospedeiros, foi utilizada uma abordagem de seleção de modelos através da regressão logística múltipla, incluindo todos os fatores abióticos (velocidade, largura, profundidade, cobertura de dossel, pH e temperatura da água) e CRC como covariável. O critério de seleção considerado foi o maior valor de AIC (*Akaike information criterion*), que resultou na escolha do modelo que incorpora todas as variáveis selecionadas para a regressão. Para testar os efeitos dos fatores abióticos locais sobre a intensidade de infecção do patógeno sobre os hospedeiros, foi utilizada uma regressão linear múltipla com todos os fatores presentes no modelo (velocidade, largura, profundidade, cobertura de dossel, pH e

temperatura da água), tendo o resíduo da interação de log *Bd load* com CRC como variável resposta.

Para avaliar se a temperatura do ar e a intensidade de *Bd* foram diferentes ao longo das estações do ano, foi utilizada a análise de variância simples (ANOVA *one-way*). A ANOVA é a técnica paramétrica padrão utilizada para inferir quais são os efeitos principais de variáveis categóricas independentes (variação sazonal) em função de uma variável quantitativa dependente (*Bd Load* ou intensidade de *Bd*) (Legender & Legender, 2012) tendo a temperatura do ar e a intensidade de *Bd* (resíduos da interação com CRC) como variáveis dependentes e as estações (chuvosa e seca) como variável independente. As análises foram implementadas no programa JASP (versão 0.9.2).

4.RESULTADOS

Foram encontrados adultos de *C. schmidtii* em todos os riachos amostrados, sem nenhum registro de indivíduos que apresentassem algum dos sinais clínicos da quitridiomiose ou mortos, totalizando 119 animais amostrados (tabela 1). A regressão logística múltipla mostrou, que tanto a temperatura do ar como e o CRC são fatores que afetam negativamente a presença de *Bd* nos hospedeiros (figura 4). Assim, vimos uma incidência maior de *Bd* nos períodos mais frios do ano, que correspondem ao outono e ao inverno ($N = 119$; $Z = -2.19$; $P = 0.028$) e entre os indivíduos menores da população ($N = 119$; $Z = -2.75$; $P = 0.005$). Durante a estação mais fria, foram amostrados 44,53% dos espécimes, dos quais 50,94% estavam infectados pelo fungo causador da quitridiomiose, já na estação mais quente, que corresponde a primavera e ao verão, foram amostrados 66% dos espécimes, dos quais 33,33% estavam infectados pelo fungo.

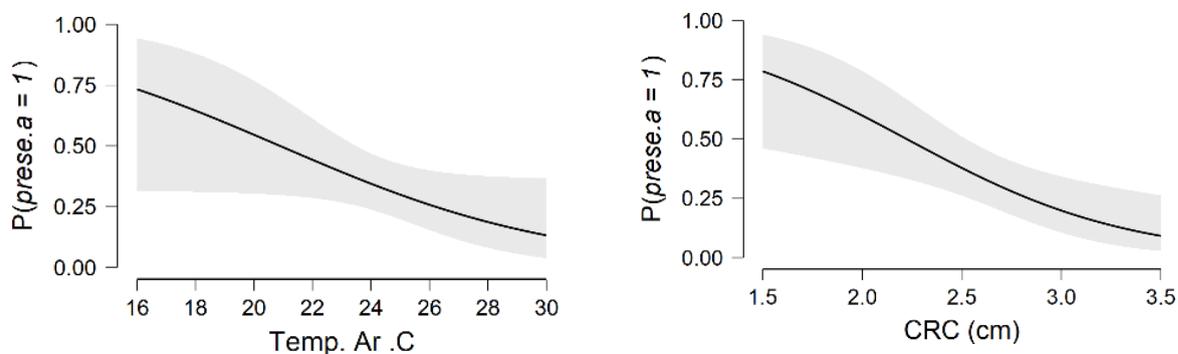


Figura 4. Efeito da variação em temperatura do ar e CRC sobre a presença de *Bd* nos hospedeiros. As figuras acima mostram o modelo observado (linha negra) e seu

respectivo intervalo de confiança de 95% (em cinza). 0 = ausência de *Bd* e 1 = presença de *Bd*.

Através da regressão linear simples, foi possível observar que o aumento do CRC reduz a intensidade (*Load*) de *Bd* nos indivíduos da população ($N = 119$, $T = -3.77$, $R^2 = -0.16$; $P < 0.05$). Como esperado, a temperatura do ar foi mais alta durante o período mais quente do que durante a estação seca ($n = 119$; $F = 62.02$; $P < 0.05$) (Figura 5). No entanto, não encontramos diferenças estatisticamente significativas de intensidade de *Bd* entre as estações ($n = 119$; $F = 0.73$; $P > 0.05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios referentes a carga e prevalência de infecção, bem como suas respectivas amplitudes de variação entre as estações do ano, onde a estação Fria corresponde ao outono e inverno e a estação Quente corresponde a primavera e ao verão.

Estação	Carga	Amplitude	Prevalência	Amplitude
Fria	36,49	33,22 – 40,53	20,70	1,41 – 111,43
Quente	37,22	26,53 – 40,79	312,29	1,09 – 6209,02

Tabela 2. Valores médios das variáveis ambientais e estruturais dos riachos amostrados, referentes aos conjuntos de dados provenientes dos 119 indivíduos dos *Crossodactylus schmidtii*, bem como a unidade de medida utilizada e a amplitude de variação dos dados.

Variável	Valores Médios	Unidade	Amplitude
Velocidade	5,54±4,57	m/s	0 – 30
Largura	141±0,71	cm	20 – 366
Profundidade	4,67±3,04	cm	0 – 18
Cobertura de dossel	68,32±8,21	%	15 – 95,6
Temperatura do ar	23,12±2,30	°C	17,1 – 28,7
Temperatura da água	19,81±1,43	°C	12,8 – 23,3
pH	7,25±0,44	-	6 – 8,2
CRC	2,57±0,33	cm	1,8 – 3,4
N	119	un	-

Dentro do modelo selecionado, e que obteve como critério de seleção a maior valor de AIC (Tabela 3), verificamos que nenhuma variável abiótica local influenciou a presença de *Bd* nos indivíduos da população de hospedeiros (Tabela 4). Nenhum dos

fatores abióticos locais explicou a variação em intensidade de infecção nos indivíduos da população de hospedeiros (Tabela 5).

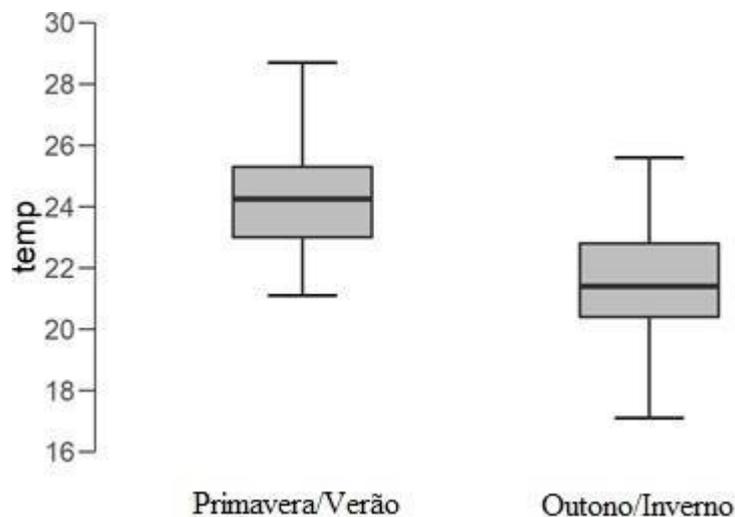


Figura 5. Variação de temperatura do ar entre as estações do ano entre Janeiro e Novembro de 2018, no interior do Parque Nacional do Iguaçu.

Tabela 3. Teste de modelos para efeitos sobre a presença de *Bd* em hospedeiros segundo efeitos abióticos locais e tamanho do corpo dos indivíduos (CRC).

Modelo	Deviance	AIC	BIC	df	ΔX^2	p	McFadden R ²	Nagelkerke R ²	Tjur R ²
1	145.6	159.612	179.066	112			0.000	0.000	0.117
2	145.8	157.752	174.426	113	0.140	0.708	0.000	0.000	0.153
3	146.0	155.997	169.892	114	0.245	0.621	0.000	0.000	0.152
4	146.2	154.182	165.298	115	0.185	0.667	0.000	0.000	0.132
5	147.0	153.042	161.380	116	0.861	0.353	0.000	0.000	0.147

Tabela 4. Efeitos específicos de fatores abióticos locais sobre a presença de *Bd* nos espécimes amostrados de *Crossodactylus schmidtii*.

Variáveis do modelo	Efeito estimado	Erro padrão	Z	P
Temperatura da água	-0.073	0.127	-0.576	0.565
Ph	0.198	0.310	0.638	0.523

Tabela 4. Efeitos específicos de fatores abióticos locais sobre a presença de *Bd* nos espécimes amostrados de *Crossodactylus schmidti*.

Variáveis do modelo	Efeito estimado	Erro padrão	Z	P
Velocidade da água	0.085	0.047	1.796	0.072
Cobertura Dossel	0.040	0.026	1.571	0.116
Profundidade riacho	-0.053	0.076	-0.701	0.483
Largura riacho	0.001	0.003	0.374	0.708
CRC	-1.475	0.630	-2.340	0.019

Tabela 5. Resultados parciais da regressão linear múltipla, mostrando a relação da intensidade de *Bd* com cada um dos fatores abióticos locais avaliados dentro no PNI.

Variáveis do modelo	Erro padrão	Efeito padronizado	T	P
Intercepto	1.622		0.673	0.502
Temperatura da água	0.051	-0.123	-1.070	0.287
Ph	0.144	0.002	0.020	0.984
Velocidade	0.014	0.033	0.322	0.748
Cobertura de dossel	0.007	-0.004	-0.042	0.967
Profundidade riacho	0.021	-0.067	-0.660	0.510
Largura riacho	8.870e -4	0.021	0.213	0.832

5. DISCUSSÃO

As características ambientais e estruturais dos habitats, são fatores determinantes na relação do fungo com seu hospedeiro (Valença – Aguilar et al. 2016). Tais características afetam as tolerâncias, bem como a dinâmica do patógeno (Becker & Zamudio, 2001; Gründler et al. 2012) e são especialmente importantes, uma vez que podem alterar os padrões de dinâmica da doença em populações, através das respostas que tais características podem gerar a longo prazo nos atributos fenotípico e comportamentais das populações (Lambertini et al. 2016). Foi observado que os fatores abióticos locais amostrados não foram estatisticamente relevantes para a ocorrência, ou para a intensidade de infecção do patógeno nos indivíduos mensurados.

Sabe-se que as interações *Bd* – hospedeiros são altamente dinâmicas, e mesmo características que pareçam ser boas preditoras na explicação da ocorrência ou não do fungo, podem ser mais ou menos importantes para moldar a resposta do patógeno, dependendo do habitat ao qual este está inserido, e das características individuais referente a história natural exibidas por seu hospedeiro (Valença – Aguilar et al. 2016). Portanto, ainda que os resultados mostrem que as variáveis abióticas consideradas não foram determinantes para a ocorrência do fungo na população avaliada, deve ser considerado que alguma outra característica abiótica negligenciada durante esse trabalho possa ser importante para a ocorrência do *Bd* em populações de *Crossodactylus schmidtii*. Estudos futuros poderiam avaliar por exemplo, a relação da precipitação (Ruggeri et al. 2015) ou da altitude (Rodder et al. 2008) com a ocorrência do fungo, a fim de melhor compreender a interação ecológica existente entre as espécies avaliadas.

Os resultados obtidos mostram que a variação térmica entre as estações do ano pode interferir na ocorrência do *Bd* nos hospedeiros, no entanto, não parece ter relação com a intensidade da infecção. Uma maior incidência do fungo durante a estação fria, que corresponde ao outono e inverno já era esperada, uma vez que trabalhos anteriores mostram que o espectro de tolerância considerado ótimo no desenvolvimento do patógeno está entre 17° C e 25° C (Piotrowski e Longcore, 2004) condição que é encontrada durante o período frio na região sul do Brasil (Figura 5). Uma vez que sob tais condições, ocorre a estimulação da replicação do patógeno no ambiente (Ruggeri et al. 2015). Com um número maior de zoósporos liberados no microhabitat, é intuitivo pensar que as probabilidades de que uma quantidade mais numerosa de hospedeiros seja infectada, seja maior. Quanto a intensidade de infecção não ter sido influenciada pela sazonalidade, pode ser entendida como uma adaptação imunológica do hospedeiro para o patógeno. De acordo com Altizer et al. (2006) as adaptações imunológicas do hospedeiro podem influenciar na intensidade de transmissão das infecções, desta forma, poderíamos considerar que os indivíduos estudados da população de *Crossodactylus schmidtii* são pouco suscetíveis a quitridiomiose, por apresentarem uma boa adaptação imunológica ao quitrídio, e por essa razão apresentam uma menor intensidade de infecção e boas chances de sobrevivência, mesmo durante os períodos mais frios do ano, que contam com uma carga mais elevada de zoósporos no ambiente, em relação aos períodos mais quentes. Nós, no entanto, acreditamos que um estudo mais profundo seria necessário para melhor avaliar essa relação, um estudo mais longo, no qual os indivíduos pudessem ser acompanhados

por um maior período, com marcação, para que assim seja possível observar as respostas de um mesmo indivíduo frente as mudanças da sazonalidade.

Considerando a relação área corporal e a superfície de contato, espera-se que indivíduos com maior tamanho corporal, possuam maior probabilidade de serem infectados (Catenazzi et al. 2013; Vieira et al. 2013). Identificamos uma relação inversa a essa premissa, onde o maior tamanho dos corpos dos indivíduos (CRC) foi proporcionalmente inverso tanto a presença do patógeno, como com a intensidade de infecção, ou seja, indivíduos maiores apresentaram menor probabilidade de estarem infectados, e quando estavam, apresentam uma menor intensidade de infecção do que indivíduos que apresentaram um menor tamanho corporal. Uma provável explicação seria a de que, os indivíduos infectados tiveram seu desenvolvimento prejudicado devido a interação com o *Bd*, que conhecidamente pode interferir nas taxas de crescimento de seus hospedeiros (Uller et al. 2006). De acordo com Bielby et al. (2015) as respostas imunológicas são custosas energeticamente, o que poderia explicar o fato dos indivíduos com o menor CRC apresentarem maior intensidade de infecção, ou seja, os indivíduos maiores podem apresentar uma resposta imune melhor do que os indivíduos menores, o que justificaria uma menor taxa de infecção (Altizer et al. 2006; Woodhams et al. 2007; Ramsey et al. 2010). Ressalta-se no entanto, que a resposta imune do hospedeiro frente ao patógeno não foi avaliada, e que essa premissa é válida somente quando assumimos que todos os indivíduos são pertencentes a um mesmo estágio de desenvolvimento, e que o menor tamanho corporal seja resultado apenas da interação do hospedeiro com o patógeno causador da quitridiomycose, sem levar em conta outros fatores igualmente importantes para o desenvolvimento dos indivíduos, como o dimorfismo sexual (Caldart, 2011), plasticidade fenotípica (Walther et al. 2002; Grözinger et al. 2014) bem como outras enfermidades que possam estar representadas nessa população, e que não foram contempladas no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que de fato no interior do PNI a espécie hospedeira avaliada está sendo colonizada pelo fungo causador da quitridiomycose, também foi possível inferir que dentro da escala micro espacial, ou seja, nos quatro riachos avaliados no interior do PNI, as variáveis ambientais mensuradas não foram significativas para o entendimento da relação existente entre o fungo *Bd* e o indivíduos de *Crossodactylus schmidti* avaliados. Observamos ainda, que a sazonalidade foi importante para a dinâmica do fungo, embora um estudo mais abrangente, que possa mensurar o comportamento de um mesmo indivíduo frente as mudanças que as estações

podem causar no microhabitat, traria resultados mais robustos para a compreensão dessa relação. E por fim, corroboramos resultados de trabalhos anteriores (Catenazzi et al. 2013; Vieira et al. 2013) que indivíduos infectados apresentam menor tamanho corporal do que indivíduos não infectados.

Desta forma, sugerimos que a população de *Crossodactylus schmidtii* avaliada pode estar atuando como reservatório do fungo *Bd* nos riachos do interior do Parque Nacional do Iguaçu, uma vez que não tenham sido evidenciados indivíduos que apresentassem os sinais clínicos da doença, mesmo quando estavam contaminados com os zoósporos do quitrídio. Essa seria uma forma de manter o fungo no ambiente até que uma população que apresente maior suscetibilidade ao fungo, seja exposta às preocupantes consequências letais da quitridiomiose. Portanto, mesmo na ausência de respostas imediatas do hospedeiro, as consequências sub letais da exposição ao fungo precisam ser consideradas e acompanhadas (Bielby et al. 2015), para que dessa forma, não atue como uma pressão desestabilizadora dentro das populações de anfíbios (Boots et al. 2003). Em vista disso, fica evidenciada a importância de estudos dessa natureza para o entendimento dos declínios populacionais de anfíbios, que podem também auxiliar no desenho de medidas conservacionistas futuras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alford, R. A. 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles* 2ed. Sparling, D. W. 13–46 SETAC Press.
- Altizer, S., A. Dobson, P. Hosseini, P. Hudson, M. Pascual, and P. Rohani. 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* 9:467–484.
- Baitchman, E. J., Pessier, A. P. 2013. Pathogenesis, diagnosis and treatment of amphibian chytridiomycosis. *Veterinary Clinics of North America* 16: 669 – 685.
- Bastiani, V. I. M., Garcia, P. C. A., Lucas, E. M. 2012. *Crossodactylus schmidti* Gallardo, 1961 (Anura: Hylodidae) in Santa Catarina state, southern Brazil: A new record and comments on its conservation status. *Check List* 8: 262-263.
- Becker C. G., Zamudio K. R. 2011. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 9893–9898.
- Becker, C.G., Rodriguez, D., Longo, A. V., Talaba, A. L., Zamudio, K. R. 2012. Disease Risk in Temperate Amphibian Populations Is Higher at Closed Canopy. *PLoS One*: 1 - 7.
- Begon, M. 2008. Effects of Host Diversity on Disease Dynamics. In: *Infectious Disease Ecology*, eds Ostfeld, R. S., Keesing, F. & Eviner, V. T., . Princeton University Press.
- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., Longcore, J. E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 68: 51 – 63.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham A. A., Goggin C. L. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 9031–9036
- Bielby, J.; Fisher, M. C.; Clare, F. C.; Rosa, G. M.; Garner, T. W. J. 2015. Host species vary in infection probability, sub-lethal effects and costs of immune response when exposed to an amphibian parasite. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 1-8.
- Blaustein, A. R. e Kiesecker, J. M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letter* 5: 597 – 608.
- Boots, M., Greenman, J., Ross, D., Norman, R., Hails, R. & Sait, S. 2003. The population dynamical implications of covert infections in host-microparasite interactions. *J. Anim. Ecol.* **72**, 1064–1072.
- Caldart, V. M., Iop, S., Santos, T. G., Cechin, S. Z.. 2010. Extension of the geographical distribution of two anuran species for Rio Grande do Sul State, Brazil, with comments on natural history. *Biota Neotropica* 10: 143-147.

- Caldart, V., M. 2011. História Natural de *Crossodactylus schmidti*, GALLARDO, 1961 (ANURA, HYLODIDAE) no Parque Estadual do Turvo, Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Campião, K. M., Silva, R. J., Ferreira, V. L. 2009. Helminth parasites of *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from Southeastern Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of helminthology* 83:345–349
- Carvalho, T., Becker, C. G., Toledo, L. F. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proc. R. Soc. B* 284: 1 – 8.
- Catenazzi, A., Lehr, E., Von May, R. 2013. The amphibians and reptiles of Manu National Park and its buffer zone, Amazon basin and eastern slopes of the Andes, Peru. *Biota Neotropica* 13: 269-283.
- Chinchar, V. G.; Hyatt, A.; Miyazaki, T.; Williams, T. 2009. Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. *Current topics in microbiology immunology* 328: 123-170.
- Chinchar, V.G. 2002. Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Archives of virology*. 147: 447-470.
- Connors, V. A. e Nickol B. B. 1999. Effects of *Plagiorhynchus cylindraceus* (Acanthocephala) on the energy metabolism of adult starlings, *Sturnus vulgaris*. *Parasitology* 103: 395–402.
- Conradie, W., C. Weldon, K.G. Smith, and L.H.D. Preez. 2011. Seasonal pattern of chytridiomycosis in common river frog (*Amietia angolensis*) tadpoles in the South African Grassland Biome. *African Zoology* 46: 95–102.
- Cushman, S.A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological conservation*. 128: 231-24.
- Daszak P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, E., Speare, R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibians population declines. *Emerging Infectious Diseases* 5: 735 – 748.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., Hyatt, A. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*. 9: 141–150.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
- Davidson, C., Benard, M. F., shaffer, H., D., Parker, J. M., O’leary, C., Conlon, J. M., Rollins – Smith, L. 2007. Effects of Chytrid and Carbaryl Exposure on Survival, Growth and Skin Peptide Defenses in Foothill Yellow-legged. *Environ. Sci. Technology*: 1771-1776.
- Driskell, E. A., Miller, D. L., Swist, S. L., Gyimesi, Z. S. 2009. PCR detection of ranavirus in adult anurans from the Louisville Zoological Garden. *J. Zoo and Wildlife. Medicine* 40: 559-563.

Figueira, C., V. 2006. Modelos de Regressão Logística. Dissertação (Mestrado em Matemática) Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Frost D.R. 2019. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. Disponível em: < <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>> Acesso em: 13 mai. 2019.

Ghosh, P. e Fischer, M. 2016. Dr Jekyll and Mrs Hyde: Risky hybrid sex by amphibian-parasitizing chytrids in the Brazilian Atlantic Forests. *Molecular Ecology* 25: 2961–2963.

Gleason, F. H., Letcher, P. M., Mcgee, P. A. 2008. Freeze tolerance of soil chytrids from temperate climates in Australia. *Mycological. Research.* 112, 976–982

Granoff, A. 1984. Frog virus 3: a DNA virus with an unusual life-style. *Progress in medical. Virology.* 30: 187-198.

Greer, A., Berril, M., Wilson, P. J. 2005. Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms.* 67: 9 -14.

Grözinger F., Thein J., Feldhaar H., Rödel M. O. 2014. Giants, Dwarfs and the Environment – Metamorphic Trait Plasticity in the Common Frog. *PLOS ONE* 9(3): e89982.

Gründler M. C., Toledo L. F., Parra-Olea G., Haddad C.F. B., Giasson L.O.M., Sawaya R. J., et al. 2012 Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Dis Aquat Org.* 97: 173–184.

Hamann, M. I., González, C. E., Kehr, A. I. 2006. Helminth community structure of the oven frog *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae) from Corrientes, Argentina. *Acta Parasitol* 51:294–299

Hanselmann, R., Rodríguez, A., Lampo, M., Farjado – Ramos, L., Aguirre, A. A., Kilpatrick, A. M., Rodríguez, J. P., Daszak, P. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation* 120: 115–119.

Harkinezhad, T. Geens, T., Vanrompay, D. 2009. Chlamydomytila psittaci infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary microbiology* 135:68-77.

Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 5476-5480.

Heyer W.R., Rand A.S., Cruz C.A.G., Peixoto O.L. 1988. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in Southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica* 20: 230–235.

Holmes, R. M., Bocchiglieri, A., Caldeira de Araújo, F. R. R., Silva, R. J. 2008. New records of endoparasites infecting *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a savanna area in Brasília, Brazil. *Parasitology Research* 102: 621–623

Hyatt, A. D., Boyle¹, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatics Organism*. 73: 175–192.

IBAMA. 1999. Plano de manejo: Parque Nacional do Iguaçu. Disponível em: <http://www.cataratasdoiguacu.com.br/manejo/siuc/planos_de_manejo/pni/html/index.htm> Acesso em: 30 ago. 2017.

ICMBIO. 2016. Sumário executivo. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Instituto Chico Mendes de Conservação da biodiversidade. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoesdiversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf> Acesso em: 20 mai. 2018. Inglis, T.J., Sagripanti, J.L., 2006. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6865–6875.

IUCN. 2019. The IUCN Red List for threatened species. Amphibians. Cambridge: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/56355/0>>; Acesso em: 25 abr. 2019.

Johnson, M. L., Speare, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatics Organism*. 65: 181–186.

Johnson, P. T. J., Lunde, K. B., Thurman, E. M., Ritchie, E. G., Wray, S. W., Sutherland, D. R., Kapfer, J. M., Frest, T. J., Bowerman, J., Blaustein, A. R. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecol Monogr* 72:151–168.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990–993.

Jordão–Nogueira, T., Vrcibradic, D., Pontes, J. A. L., Van Sluys, M., Rocha, C. F. D. 2006. Natural history traits of *Crossodactylus aeneus* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae) from an Atlantic Forest area in Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology* 1: 37-41.

Kauano, E. E., Torezan, J. M. D., Cardoso, F. C. G., Marques, M. C. M. 2012. Landscape structure in the northern coast of Paraná state, a hotspot for the Brazilian Atlantic Forest conservation. *Árvore*. 36: 961 – 970

Keiscker, J. M. e Skelly D. K. 2001. Effects of disease and pond drying on gray tree frog growth, development, and survival. *Ecology* 82: 1956–1963.

- Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J., Daszak, P. 2009. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*. 25: 109 – 118.
- Lambertini, C., Rodriguez, D., Brito, F. B., Leite, D. S., Toledo, L F. 2013. Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira*. 2: 12 – 17.
- Legendre, P., Legendre, L. L. 2012. *Numerical Ecology*. 3ed. Amsterdam: Elsevier.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp nov, a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227.
- Lucas, E. M. e Garcia P. C. A. 2011. Amphibia, Anura, Hylidae Rafinesque, 1815 and Hylodidae Günther, 1858: Distribution extension and new records for Santa Catarina, southern Brazil. *Check List* 7: 13-16.
- Lunaschi, L. I., Drago, F. B. 2007. Checklist of digenean parasites of amphibians and reptiles from Argentina. *Zootaxa* 1476: 51–68
- McDonald, K. R., Méndez, D., Müller, R., Freeman, A. B., Speare, R. 2005. Decline in the prevalence of chytridiomycosis in upland frog populations in North Queensland, Australia. *Pacific conservation Biology* 11:114–120
- Mendonça, F., Oliveira, I. M. D. 2007. *Climatologia: noções básicas e climas do Brasil*. São Paulo: Oficina de Textos.
- Mutschmann, F. 2015. Chytridiomycosis in amphibians. *Jornal of Exotic Pet Medicine* 24: 276 – 282.
- Narayan, E.J., C. Graham, H. McCallum, and J.-M. Hero. 2014. Over-wintering tadpoles of *Mixophyes fasciolatus* act as reservoir host for *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One* 9:e92499.
- Navas, C. A., Otani, L. 2007. Physiology, environmental change, and anuran conservation. *Phyllomedusa* 6: 83–103.
- O’Hanlon, S. J. Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T. A., Murray, K. A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M. D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A., Cunningham, A. A., Doherty-Bone, T. M., Ghosh, P., Gower, D. J., Hintz, W. E., Höglund, J., Jenkinson, T. S., Lin, C., Laurila, A., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, S., Minting, P., Pasmans, F., Schmeller, D. S., Schmidt, B. R., Shelton, J. M. G., Skerratt, L. F., Smith, F., Soto-Azat, C., Spagnoletti, M., Tessa, G., Toledo, L. F., Valenzuela-Sánchez, A., Verster, R., Vörös, J., Webb, R. J., Wierzbicki, C., Wombwell, E., Zamudio, K. R., Aanensen, D. M., James, T. Y., Gilbert, M. T., Weldon, C., Bosch, J., Balloux, F., Garner, T. W. J., Fisher, M. C. 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360: 621–627.

- Ostfeld R. S, Keesing F. 2012. Effects of host diversity on infectious disease. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43, 157–182.
- Pessier, A. P. 2007. Cytologic diagnosis of disease in amphibian. *Veterinary clinics Exotic animal practice* 10: 187–206.
- Piotrowski J.S., Annis S.L., Longcore J.E. 2004, Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.
- Poyton, S. L., Whitaker, B. R. 2001. Protozoa and Metazoan infecting amphibians. *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar: Krieger Publishing Company: 182 – 191.
- Rachowicz, L. J. e Vredenburg, V.T. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of aquatics. organisms* 61: 75–83.
- Raffel, T. R., Rohr, J. R., Kiesecker, J. M., Hudson, P. J. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Funct Ecol.* 2006; 20: 819–828.
- Raffel, T.R., P.J. Michel, E.W. Sites, and J.R. Rohr. 2010. What drives chytrid infections in newt populations? Associations with substrate, temperature, and shade. *EcoHealth* 7:526–536.
- Ramsey, J.P., L.K. Reinert, L.K. Harper, D.C. Woodhams, and L.A. Rollins-Smith. 2010. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity* 78:3981–3992.
- Reed, K. D., Ruth, G. R., Meyer, J. A., Shukla, S.K. 2000. *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of Africa clawed (*Xenopus tropicalis*). *Emerging Infectious Diseases* 6: 196 – 199.
- Retallick, R. W. R., McCallum, H., Speare, R. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biol* 2: 1965 – 1971.
- Robert, J. 2010. Emerging ranaviral infectious diseases and amphibian decline. *Diversity*. 2: 314-330.
- Rodder, D., M. Veith, and S. Lötters. 2008. Environmental gradients explaining the prevalence and intensity of infection with the amphibian chytrid fungus: The host's perspective. *Animal Conservation* 11:513–517.
- Rosenblum E. B. 2013 Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proc. Natl Acad. Sci.* 110: 9385 – 9390.
- Ruggeri, J., Longo, A. V., Gaiarsa, M., Alencar, L. R. V., Lambertini, C., Leite, D. S., Carvalho – e –Silva, S. P., Zamudio, K. R., Toledo, L. F., Martins, M. 2015. Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream – dwelling frogs of the Brazilian Atlantic forest. *Plos one* 10: 1 – 12.

- Sherman, C. K. e Morton, M. L. 1993. Population declines of yosemite toads in the Eastern Sierra Nevada of California. *Journal of Herpetology*, 27: 186-198.
- Skerratt, L. F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K. R., Phillott, A. D., Hines, H. B., Kenyon, N. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4: 125–134.
- Sparling, D.W. 2010. Water-quality criteria for amphibians. Pp. 105–117 in *Amphibians Ecology and Conservation* (C.D. Kenneth, ed.). Oxford University Press, USA.
- Taylor, K., Williams, E. S., Mills, K. W. 1999. Mortality of Captive Canadian Toads from *Basidiobolus ranarum* Mycotic Dermatitis. *Journal of Wildlife Diseases*: 35: 64-69.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F., De Siqueira, M.F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., Van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Peterson, A.T., Phillips, O.L., Williams, S.E. 2004 Extinction risk from climate change. *Nature* 427:145–148.
- Uller, T., Isaksson, C. & Olsson, M. 2006. Immune challenge reduces reproductive output and growth in a lizard. *Funct. Ecol.* **20**, 873–879.
- Valencia – Aguilar, A., Toledo, L. F., Vital, M. V. C., Mott, T. 2016. Seasonality, Environmental Factors, and Host Behavior Linked to Disease Risk in Stream-Dwelling Tadpoles. *Herpetologica*, 72: 98–106.
- Venesky, M. D., Wassersug, R. J., Parris, M. J. 2010. Fungal pathogen changes the feeding kinematics of larval anurans. *Journal of Parasitology*96: 552-557.
- Vieira, C.A., L.F. Toledo, J.E. Longcore, and J.R. Longcore. 2013. Body length of *Hylodes cf. ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. *Brazilian Journal of Biology* 73:195–199.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campebell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R. A., Skerratt, L. F., Speare, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* 326: 582 – 585.
- Wake D.B., Vredenburg, V.T. 2008. Colloquium paper: Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11466–11473.
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, et al. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416: 389–395
- Weygoldt P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? *Stud Neotrop Fauna Environ*;243: 249–255.

Weyrauch, S.L., Grubb, T.C., Jr. 2006. Effects of the interaction between genetic diversity and UV-B radiation on wood frog fitness. *Conservation Biology*. 20: 802-810.

Wikelski M., Cooke, S. J. 2006. Conservation physiology. *Trends Ecol Evol* 21: 38–46.

Woodhams D. C., Vredenburg V.T., Simon M., Billheimer D., Shakhtour B., Shyr Y. et al. 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biol Conserv* 138: 390–398.

Woodhams, C. D., Alford, R. A., Briggs, C. J., Johnson, M., Rollins - Smith, L. A. 2008. Life- History trade – offs influence disease in changind climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*. 89: 1627 – 1639.

Wright, K. M., Whitaker, B. R. 2001. *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger Publishing, Malabar, FL, 318–319.

Wright, K. M., Whitaker, B. R. 2006. Overview of amphibian medicine. *Reptile e Medicine and surgery*. Sant Louis: Sauderes 941 – 971.

Young, B., K. R. Lips, J. K. Reaser, R. Ibarez, A. W Salas, J. R. Cedeno, L. A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J. R. Meyer, A. Muroz, E Bolamos, G. Chaves, e D. Romo. 2001. Population declines and priorities for Amphibian conservation in Latin America. *Conserv. Biol*. 15: 1213- 1223.