

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

PROJETO DE TESE

INFLUÊNCIA DA ALTERAÇÃO AMBIENTAL SOBRE A
QUITRIDIOMICOSE EM COMUNIDADES DE GIRINOS NO SUL DO BRASIL

ALUNA DE DOUTORADO EM BIOLOGIA: ROSELI COELHO DOS SANTOS

ORIENTADOR: ALEXANDRO MARQUES TOZETTI

INTRODUÇÃO

O comércio e a introdução de espécies exóticas, a destruição e alteração de habitat, mudanças climáticas, contaminação química e patógenos são os principais fatores que contribuem para o aumento da quitridiomicose (Hayes *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Wake & Vredenburg, 2008), uma doença pandêmica causada pelo fungo quitridio, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1999; Daszak *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2004), que atualmente vem promovendo declínios e extinções dos anfíbios (Stuart *et al.*, 2004). Os primeiros registros de declínio de anfíbios ocorreram nos anos de 1970 e posteriormente, nos anos de 1990 os declínios passaram a ser associados ao fungo *Bd* (Berger *et al.*, 1998; Lips, 1999; Daszak *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2004; O'Hanlon *et al.*, 2018). Sua ocorrência já foi registrada em todos os continentes, exceto na Antártida (O'Hanlon *et al.*, 2018), tendo infectado mais de 700 espécies de anfíbios, ocasionando eventos de mortalidade e extinções locais (Lips, 2016), através de linhagens virulentas do patógeno. A distribuição e a formação de linhagens virulentas à nível mundial, é atribuída principalmente ao comércio e a introdução de espécies exóticas (Liu *et al.*, 2013). A Ásia é apontada como um provável local de origem do *Bd*, com linhagens endêmicas (O'Hanlon *et al.*, 2018), porém, existem outras linhagens endêmicas, como o *Bd*-Brasil que coexiste com o *Bd*-GPL, uma linhagem panzoótica global (Schloegel *et al.*, 2012), ocorre principalmente em regiões subtropicais (Greenspan *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram que híbridos formados a partir do *Bd*-Brasil e do *Bd*-GPL formam linhagens com maior potencial de virulência (Greenspan *et al.*, 2018), podendo elevar os riscos de infecção dos anfíbios (Olson & Ronnenberg, 2014).

Rápidos declínios e extinções ocorrem em diversas partes do mundo pela combinação de dois ou mais fatores (Beebee & Griffiths, 2005; Carnaval, 2006; Wake & Vredenburg, 2008). Eles atuam sinergicamente resultando em estresse fisiológico e imunossupressão nos anfíbios, facilitando a ocorrência de infecções por agentes patogênicos (Schar *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2010). A ocorrência do fungo *Bd* está associada a fatores bióticos e abióticos como a temperatura (Piotrowski *et al.*, 2004; Sonn *et al.*, 2017), pH (Piotrowski *et al.*, 2004; Simpkins *et al.*, 2017), altitude (Piovia-Scott *et al.*, 2011) e capacidade de resistência de algumas espécies, resultantes de interações entre hospedeiro e parasita (Blaustein *et al.*, 2012; Krynak *et al.*, 2016). O *Bd* apresenta crescimento ótimo entre 17 e 23°C, não tolerando temperaturas superiores a 29°C e inferiores a 0°C (Piotrowski *et al.*, 2004; Lips *et al.*, 2008; Woodhams *et al.*, 2008). Sendo que a maior parte dos anfíbios é altamente dependente do ambiente aquático, principalmente os anuros que tem ciclo de vida bifásico, com desenvolvimento de girinos (McDiarmid & Altig, 1999). Anfíbios que vivem em ambientes com temperatura entre ~10-16°C tem mais risco de infecção do que outras espécies de clima quente (Greenberg *et al.*, 2017). E espécies com sistema de reprodução explosiva tem menor risco de infecção (Greenberg *et al.*, 2017). Desta forma, a quitridiomycose afeta diferentemente os anfíbios ao longo do ciclo de vida (Catenazzi *et al.*, 2013; Rachowicz & Vredenburg, 2004). Girinos normalmente apresentam elevadas prevalências e carga de infecção, porém não foram reportados eventos de mortalidade, associando-os a condição de reservatório do *Bd* (Garner *et al.*, 2009).

Lagoas e riachos são dois ambientes distintos, porém, a presença de vegetação dentro dos micro habitats pode determinar uma maior riqueza de comunidades de girinos (Melo *et al.*, 2017). Desta forma, a vegetação aumenta a complexidade do habitat aquático, favorecendo o provimento de alimentos (Peltzer & Lajmanovich, 2004). Os fatores químicos da água não influenciam na composição de espécies de girinos (Provete *et al.*, 2014), porém, o seu desenvolvimento e a sobrevivência é afetado pela qualidade da água (Miner *et al.*, 2005). Além disso, há uma modificação da microbiota bacteriana nos anfíbios entre os estágios de girinos e adultos, possivelmente, esta alteração se deve às mudanças fisiológicas em consequência da metamorfose (Bates *et al.*, 2018). Algumas espécies se mostram mais sensíveis do que outras (Searle *et al.*, 2011; Mesquita *et al.*, 2017) devido a resposta do sistema imunológico associada a microbiota da pele (Krynak *et al.*, 2016). É muito provável que haja variações na prevalência e carga de infecção entre ambientes lânticos e lóticos, associadas às condições morfológicas do habitat.

Girinos são comumente utilizados em experimentos com exposição ao fungo *Bd* (Martel *et al.*, 2013; Gervasi *et al.*, 2013). Por não apresentarem altos índices de mortalidade, os girinos são considerados como reservatórios da doença (Daszak *et al.*, 2003; Rachowicz & Vredenburg, 2004; Blaustein *et al.*, 2005; Valencia-Aguilar *et al.*, 2016). Girinos de ambientes aquáticos permanentes apresentaram maiores cargas de infecção por *Bd* do que girinos de ambientes temporários, porém, menor prevalência (Ruggeri *et al.*, 2018), sugerindo haver diferença entre ambientes lóticos e lênticos. A história de vida das espécies pode ser importante para entender a dinâmica do fungo (Ruggeri *et al.*, 2018) principalmente em regiões como a Mata Atlântica, que além de ser um “hotspot” de biodiversidade (Mittermeier *et al.*, 2005) e centro de endemismo (Haddad *et al.*, 2013), é também um local em que o quitrídio está amplamente distribuído (Carvalho *et al.*, 2017; Greenspan *et al.*, 2018). Considerando que anfíbios com desenvolvimento direto podem ser mais susceptíveis à infecção (Mesquita *et al.* 2017), a alteração do habitat tende a favorecer o patógeno na relação patógeno-hospedeiro, uma vez que a fragmentação do habitat leva ao isolamento de populações de anfíbios e facilita a disseminação do fungo (Greenspan *et al.*, 2018). Neste contexto, não é possível compreender se tanto ambientes preservados quanto ambientes alterados apresentam as mesmas condições de prevalência e intensidade de infecção pelo *Bd* nas comunidades de anfíbios, sendo muito provável que a atividade do fungo responda diferentemente conforme a condição local do ambiente.

A história de vida e o tipo de habitat são fatores importantes para a compreender o risco e a intensidade de infecção, espécies com alta produtividade e rápido desenvolvimento podem ser mais sensíveis a infecção (Han *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2012), devido ao seu custo energético para o desenvolvimento. Desta forma, é possível prever que espécies com desenvolvimento larval mais rápido e que estão em ambientes lênticos possam apresentar maior prevalência de *Bd*, principalmente associados a temperaturas mais baixas.

Os fatores ambientais são importante métricas para avaliar a riqueza e composição de espécies de ambientes aquáticos (Sternet *et al.*, 2012). As características locais dos corpos d’água determinam sua ocorrência, portanto, o tipo de vegetação, tamanho dos corpos d’água e a sua profundidade interferem diretamente na composição da comunidade de anfíbios (Gonçalves *et al.*, 2014). Em áreas abertas o tamanho do lago ou riacho e a profundidade da água podem contribuir para evitar a dessecação, diminuindo os riscos para girinos (Santos *et al.*, 2007) e favorecer espécies com crescimento

prolongado (Conte & Rossa Feres, 2006). Além disto, as características ambientais são importantes para avaliar a ocorrência do fungo *Bd*, que apresenta variação na prevalência e carga de zoósporos em diferentes condições ambientais (Sonn *et al.*, 2017), estando associado à temperatura da água, temperatura do ar e pH (Santos *et al.*, no prelo). Desta forma, além das características ambientais influenciarem no estabelecimento e manutenção das espécies nos sítios reprodutivos, são também relacionadas a ocorrência de doenças pandêmicas, como a quitridiomicose. O *Bd* é prevalente tanto em anfíbios de ambientes lênticos e quanto lóticos (Johnson & Speare, 2005; Lips *et al.*, 2006; Rowley & Alford, 2007; Kolby *et al.*, 2015; Ruggeri *et al.*, 2018), sendo que a prevalência e patogenicidade do *Bd* é intimamente dependente da condição climática local (Kriger & Hero, 2007). Alterações físicas e químicas nos ambientes naturais provocadas pela interferência humana podem afetar os sítios reprodutivos dos anfíbios, e conseqüentemente a sua condição de resistência às doenças letais. Estudos mostram que a presença do herbicida Glifosato altera a comunidade bacteriana do solo imediatamente após o seu uso, sendo acentuado o resultado, com a presença de fósforo (Primon *et al.*, 2013), desta forma, é possível prever que corpos d'água também estejam contaminados com o herbicida, e conseqüentemente girinos que se encontram nestes locais possam apresentar infecção por *Bd*, apresentando maior prevalência e carga de infecção nestes ambientes.

Os sinais clínicos da quitridiomicose em anfíbios adultos são hiperplasia epidérmica e hiperqueratose (Smith *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2008), com alterações na função osmorregulatória, promovendo o desequilíbrio eletrolítico e a morte (Voyles *et al.*, 2009) e em girinos são identificadas deformações na boca queratinizada (Fischer *et al.*, 2009), com despigmentação (Berger *et al.*, 1998) e também lesões na região da cauda (Brodman & Briggler, 2008). No entanto, alguns estudos não encontraram uma forte relação entre deformidades e o *Bd*, resultando em falsos positivos que podem ser confirmados com técnicas complementares, ou também com outros fatores como a contaminação química (Vieira & Toledo, 2013; Navarro-Lozano *et al.*, 2017).

Justificativa

Existem poucos estudos que utilizam girinos em ambientes naturais para compreender a dinâmica do *Bd* no Brasil (Toledo *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2017; Ruggeri *et al.*, 2018; Navarro-Lozano *et al.*, 2017), principalmente na Mata Atlântica. A presença de *Bd* em girinos é um indicativo que o fungo está em todos os ambientes, mas

analisar a qualidade da água e as características morfológicas do ambiente pode mostrar como a infecção responde as alterações do habitat.

Estudos que visem analisar a diferença na presença e intensidade de infecção comparando ambientes lênticos e lóticos, em locais florestados e abertos sujeitos a contaminação química por esgotos domésticos e/ou poluentes como o herbicida glifosato são importantes para compreender se a condição de poluição dos ambientes aquáticos afeta diretamente as comunidades de anfíbios, aumentando os riscos de infecção por quitridiomiose.

Este estudo poderá contribuir para ampliar informações sobre a quitridiomiose na região sul da Mata Atlântica, comparando ambientes preservados com ambientes alterados antropicamente, tentando compreender a dinâmica do *Bd* nestes ambientes e sua influência sobre as comunidades de anfíbios anuros que estão presentes neste importante bioma. Desta forma, nossos resultados poderão reforçar o importante papel das florestas na preservação de espécies de anfíbios no sul do Brasil, principalmente na manutenção da biodiversidade.

Hipóteses

As hipóteses são de que:

A prevalência e a carga de infecção do *Bd* será maior em girinos presentes nos corpos d'água lênticos uma vez que a água parada favorece a exposição ao *Bd*.

A prevalência e carga de infecção do fungo nos girinos será maior nos corpos d'água lênticos com um maior nível de contaminação por pesticidas, uma vez que são habitats estressantes e potencializam a infecção.

Espécies com maior tempo de desenvolvimento tem maior tempo de exposição à água e ao *Bd* e apresentarão maior prevalência e carga de infecção. Considerando que a presença de esgoto doméstico seja um fator de estresse, esperamos que os girinos de corpos d'água com maior nível de poluição apresentem maior prevalência do fungo.

Objetivo geral

Avaliar como o tempo de metamorfose bem como o tipo de habitat afetam as taxas de infecção de girinos por quitridiomiose (*Bd*). Pretendemos comparar as taxas de infecção em diferentes espécies de girinos de diferentes corpos de água (lênticos e lóticos), diferentes habitats (corpos d'água no interior de floresta ou em áreas abertas), e com diferentes níveis de exposição a contaminantes.

Objetivos específicos

- Comparar a prevalência e a carga de infecção por *Bd* em taxocenoses de girinos de corpos d'água lênticos e lóticos, localizados em diferentes habitat (interior de floresta e áreas abertas);

- Avaliar como o tempo de metamorfose (girinos com desenvolvimento mais lento ou mais rápido) afeta as prevalências e cargas de infecção por quitridiomiose;

- Comparar a prevalência e carga de infecção por *Bd* em girinos de corpos d'água com diferentes níveis de contaminação (esgoto doméstico, agrotóxicos);

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

A pesquisa será desenvolvida na região sul do Brasil, nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, entre as latitudes 22°30' e 33°45'S e longitudes 48°02' e 57°40'W. A região sul do Brasil abrange regiões com clima do tipo *Cfa* (Clima temperado úmido com verão quente), com altitudes que variam entre 650 a 800m e *Cfb* (Clima temperado úmido com verão ameno) é registrado parcialmente nos três Estados, em regiões com maiores elevações, de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al. 2013). A pluviosidade da região varia entre 1600 a 2200 mm anuais. E a vegetação predominante é denominada Floresta de Araucária, subdivida em Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Semidecidual (SOS Mata Atlântica/INPE, 2008) e de interior (Ribeiro et al. 2009). As áreas de pesquisa serão composta por corpos de água lênticos e lóticos que estão situados dentro e próximo de Unidades de Conservação (UCs) (Figura 1).

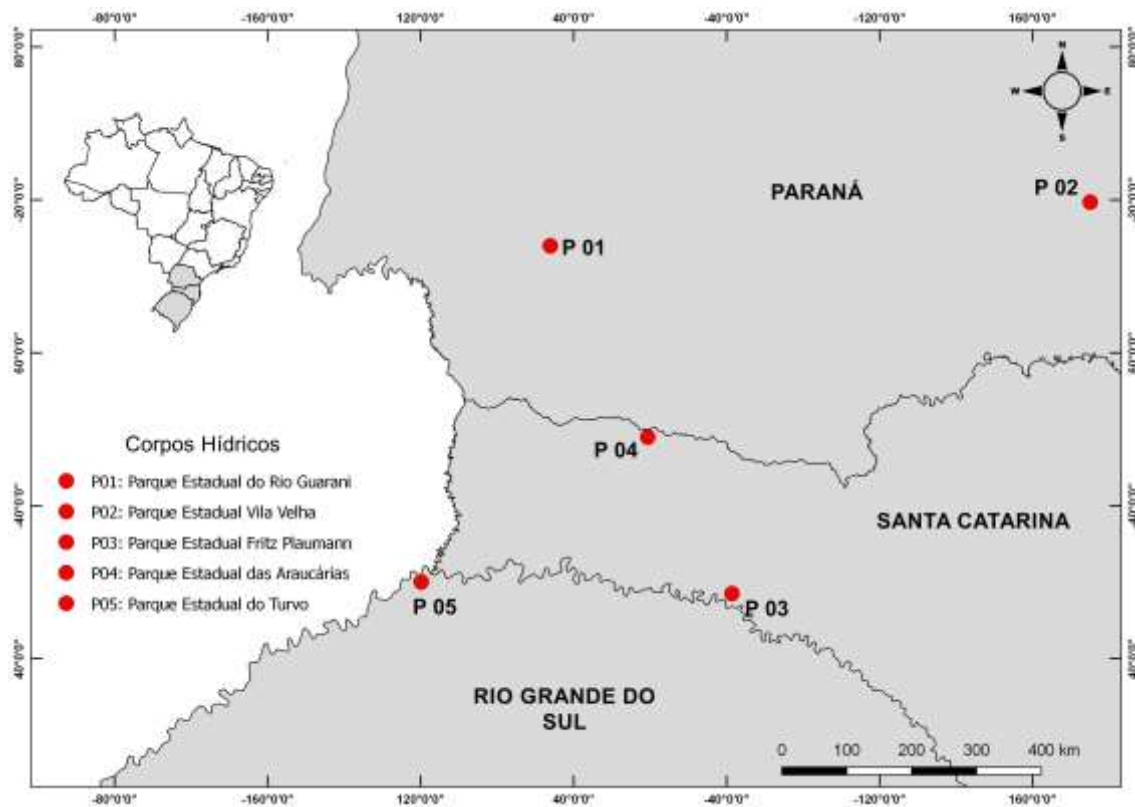


Figura 1. Mapa com a localização dos locais de coleta, em Unidades de Conservação.

Para este estudo foram escolhidos sistematicamente, dentro do quadrado da área, cinco matrizes amostrais contendo florestas preservadas (FP) em Unidades de Conservação (UCs), que apresentem características similares de composição vegetal, presença de ambiente lótico (riachos) e presença de ambiente lêntico (lagoas). No entorno de cada UC, a uma distância de no máximo 10 km da UC, será amostrada uma unidade amostral (UA) em floresta alterada (FA; área aberta), apresentando também, características similares de composição vegetal, presença de ambiente lótico (riachos) e presença de ambiente lêntico (lagoas), totalizando, cinco matrizes amostrais e 10 UAs (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição das áreas de coleta. Matrizes amostrais, divididas em Unidades Amostrais (U. A.) em Florestas Preservadas (FP) e Áreas Abertas (AA); Coordenadas geográficas de Latitude e Longitude, Corpo Hídrico, área em ha e localidade. PE = Parque Estadual; PP = Propriedade Particular.

Matriz	U. A.	Latitude	Corpo hídrico	Área (ha)	Localidade
01	FP	25° 26' S e 53° 8' W	PE Rio Guarani	2.235,00	Três Barras do Paraná/PR
	FA		PP entorno do PE Rio Guarani		
02	FP	25°12'34" e 49°58'04"	PE de Vila Velha	3.122,00	Ponta Grossa/PR
	FA		PP entorno do PE Vila Velha		
03	FP	27°16'18"S e 52°04'15"W	PE Fritz Plaumann	735,11	Concórdia/SC
	FA		PP entorno do PE Fritz Plaumann		
04	FP	26°27'08"S e 52°33'56"W	PE das Araucárias	625,11	São Domingos e Galvão/SC
	FA		PP entorno do PE das Araucárias		
05	FP	27°07'S a 53°48'W	PE do Turvo	17.491,4	Derrubadas/RS
	FA		PP entorno do PE do Turvo		

O projeto será submetido aos órgãos ambientais competentes, nacional (Sisbio) e as autoridades estaduais para autorização da pesquisa de campo. As coletas dentro das UCs serão realizadas após autorização oficial do Instituto Ambiental do Paraná (IAP)/ PR, Fundação do Meio Ambiente (FATMA)/SC e Secretaria do Meio Ambiente (SEMA)/RS. As coletas nas Propriedades Particulares, serão realizadas após autorização por escrito dos proprietário, a qual será solicitada na data da coleta.

O projeto será submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unisinos, para que a mesmo autorize e valide a coleta de campo. O período de coleta será de setembro de 2018 a abril de 2020. As coletas serão realizadas durante o dia.

Delineamento amostral

A coleta de amostras será realizada em cinco unidades amostrais em FP (1- Lótico; 2- Lêntico) e cinco unidades amostrais em FA (1- Lótico; 2- Lêntico), totalizando 20 unidades amostrais. Em cada UA serão coletados 150 girinos, nos estágios 25 a 40 *sensu* Gosner (1960), totalizando um N aproximado de 3.000 girinos, sendo 1.500 em FP e 1.500 em AA (Tabela 2).

Tabela 2. Total de girinos a serem coletados em cada Unidade Amostral. MA = Matriz Amostral; UA = Unidade Amostral; FP = Floresta Preservada; e AA = Área Aberta.

MA	UA	Nº UA	Nº Girinos/UA
FP	Lótico	05	150
	Lêntico	05	150
AA	Lótico	05	150
	Lêntico	05	150
Total		20	3000

Os girinos serão coletados com rede de imersão (Ruggeri *et al.*, 2018) e acondicionados em recipientes plásticos contendo água coletada na mesma localidade onde se encontram. Em seguida serão selecionados os indivíduos por estágio de desenvolvimento, e serão mantidos somente os girinos entre os estágios 25 a 40 *sensu* Gosner (1960) (Navarro-Lozano *et al.*, 2018, os demais girinos serão devolvidos no mesmo local de coleta. Os girinos serão coletados de acordo com a legislação, para isso, serão eutanasiados com uso de lidocaína 2% (CONCEA, 2018), preservados em álcool 90% em frascos individualizados e identificados por pontos amostrais em cada matriz. Posteriormente, os girinos coletados serão transportados ao Laboratório de Ecologia de Vertebrados Terrestres da Unisinos, para a realização do estudo histológico. Ainda em campo, serão coletadas as informações ambientais, classificadas em dois grupos, variáveis químicas da água e variáveis morfológica do ambiente.

Análise histológica

Para a identificação da presença de quitridiomicose em girinos, é utilizado mais comumente o uso de técnicas de histologia, com visualização da boca queratinizada com uso de estereoscópio, observando alterações nas estruturas da boca, como despigmentação ou deformidades na bainha da mandíbula superior ou inferior, nas fileiras superiores ou inferiores de dentes (Drake *et al.*, 2007; Navarro-Lozano *et al.*, 2017;

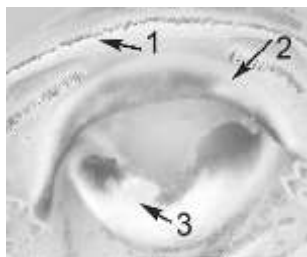
Kadearu & Une, 2018; Tabela 3). Para a confirmação da presença de zoosporângios é recomendado o uso de microscópio de aumento (400x) (Vieira & Toledo, 2013; Lambertini *et al.*, 2013). O uso desta técnica se justifica pelo baixo custo e pela eficiência em identificação da presença de desqueratinização, podendo ser associada ao *Bd* (Navarro-Lozano *et al.*, 2017). Ela se mostra confiável e comparável à técnica de qPCR, que pode ser utilizada complementarmente para quantificação da infecção (Carvalho *et al.*, 2017; Navarro-Lozano *et al.*, 2017; Kadearu & Une, 2018).

Para cada indivíduo será mensurada a massa (mg) e o comprimento (mm) dos indivíduos, com uso de balança digital de precisão e paquímetro (Digital caliper 300 mm). Os girinos serão classificados à nível de espécie, com auxílio de chaves de identificação de girinos (Machado & Maltick, 2007; Gonçalves, 2014). A presença de deformidades será identificada com uso de estereoscópio e para confirmar se a desqueratinização está associada com a infecção por *Bd*, será feita a decapitação dos indivíduos com presença de deformidade, com uso de lâmina estéril. As peças bucais serão acondicionadas em tubos plásticos estéreis e individuais, contendo álcool absoluto (Ruggeri *et al.*, 2018; Kadearu & Une, 2018). Para a análise histológica dos tecidos com os zoosporângios serão preparadas lâminas e utilizado um microscópio com aumento de 400x (Vieira *et al.*, 2013; Lambertini *et al.*, 2013).

Tabela 3. Descrição das desqueratinizações esperadas na análise histológica e a descrição técnica para sua classificação.

Desqueratinizações esperadas	Descrição técnica	Referências
1. Desqueratinização parcial (JS): Alteração na bainha da mandíbula superior ou inferior. 	As desqueratinizações classificadas entre parcial ou completa ausência de estruturas queratinizadas nas peças bucais: JS - Girinos com falta de queratinização somente na bainha da mandíbula superior e / ou inferior), girinos com ausência de queratinização, com tecido de suporte não rompido, apenas em fileiras de dentes superiores e / ou inferiores), e girinos com falta de queratinização nas bainhas mandibulares e fileiras de dentes).	Carvalho <i>et al.</i> , 2017. Knapp & Morgan, 2006. Drake <i>et al.</i> , 2007. Navarro-Lozano <i>et al.</i> , 2018. Vieira <i>et al.</i> , 2013. Kadearu & Une, 2018.
2. Desqueratinização parcial (JR): Alterações nas fileiras de dentes superior ou inferior. 		
3. Desqueratinização total (JT):		

Alterações na bainha da mandíbula superior e inferior e nas fileiras de dentes.



JR - Somente na mandíbula superior e/ou inferior, ou somente ausência de fileiras de dentes superiores e/ou inferiores.

JT - Desqueratinização completa, com ausência de queratinização nas fileiras de dentes (1 e 2) e bainha mandibulares (3).

Análise molecular

A carga de zoósporos é obtida por meio da técnica de qPCR, com material micótico coletado das partes bucais dos girinos, obtido com uso de *swab* (Boyle *et al.* 2004; Lambertini *et al.*, 2013), de pedaços de tecidos retirados da boca (Carvalho *et al.*, 2017) ou ainda, a partir da cultura de zoosporângios (Lambertini *et al.*, 2013), submetidos à técnica de extração do DNA (Boyle *et al.* 2004; Lambertini *et al.*, 2013).

Do total de girinos amostrados neste trabalho, teremos indivíduos com presença e ausência de *Bd*, resultante da análise histológica, portanto, para a análise molecular, será feita uma sub amostragem dos indivíduos. Para isto, serão escolhidos 10 girinos com a presença de desqueratinização e 10 girinos sem a presença de desqueratinização (Carvalho *et al.*, 2017) de cada unidade amostral, totalizando entre 200 a 400 amostras de material micótico. Os girinos ficarão no Laboratório de Ecologia de Vertebrados Terrestres durante as análises, e posteriormente, os girinos que não forem decapitados serão tombados na Coleção de Zoologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Neste trabalho, optaremos pela retirada de uma parte da boca dos girinos, que serão identificadas individualmente, acondicionadas em *ependorffs*, contendo álcool absoluto, e estocadas. Posteriormente, será realizada a extração do DNA das amostras, no laboratório de Genética da Unisinos, seguindo o procedimento proposto por Boyle *et al.* (2004) e as alterações feitas por Lambertini *et al.* (2013). Será adicionado 50 µl de PrepMan™ ULTRA Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems by Life Technologies) em cada *ependorff*, contendo o material micótico extraído da boca dos girinos. Na sequência, os *ependorffs*, serão agitados em vortex por 45 segundos, centrifugados por 30 segundos a 12.000 RPM e agitados novamente em vortex por mais 45 segundos. Na etapa seguinte, os *ependorffs*, serão aquecidos em banho com água fervente por 10 minutos, resfriado em temperatura ambiente por 2 minutos, e

centrifugados novamente por 1 minuto a 12.000 RPM. Serão transferido aproximadamente 45 µL da solução para novos tubos. Ao final deverá ser centrifugado por 10 minutos a 12.000 RPM e preparada uma diluição de 1:10 do material genético que ficará estocado em freezer à temperatura de -22°C (Lambertini *et al.*, 2013). Para realizar o qPCR o material será transportado para o Laboratório de Micologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Para realizar o qPCR será preparado um “reaction master mix” em uma placa de 96 poços contendo: 1250 µL de Taqman Master Mix (Applied Biosystems®), 125µL do primer (Boyle *et al.*, 2004) ITS1-3 Chytr (5’CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3’) concentrado à 18 µM, 125 µL do primer 5.8S Chytr (5’-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA-3’) concentrado à 18 µM, 125 µl da sonda ChytrMGB2 (5’-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3’) concentrada à 5 µM, 275 µL de água destilada, e 100 µL de BSA (Bovine Albumin Serum / Soro Albumina Bovina). Será preparada uma placa de qPCR adicionando 20 µL do mix em cada poço da placa e 5 µL do DNA extraído e diluído a 1:10 a partir da segunda coluna da placa. Será adicionado DNA de uma cepa padrão (CFLT 159) em concentrações conhecidas e nas diluições 10³, 10², 10, 1 e 10⁻¹ equivalentes genômicos (sendo os dois últimos em duplicata) para a construção da curva padrão nos sete poços da primeira e segunda coluna da placa. Será preparado também o controle negativo sem DNA (água destilada) no último poço da primeira e segunda coluna da placa (Lambertini *et al.*, 2013). Serão consideramos como indivíduo infectado (*Bd*⁺) aquele com pelo menos um equivalente genômico (e.g.) de zoósporo de *Bd* (Kriger *et al.*, 2007).

Análise química da água e morfológica dos corpos d’água

As características químicas e morfológicas das lagoas e riachos serão registradas da seguinte forma: área superficial (m²), da lagoa ou a largura (m) do riacho, profundidade máxima (m) e vegetação aquática (%). A vegetação aquática será estimada visualmente, dividindo a superfície da lagoa em quadrantes, estimando a vegetação em porcentagem de complexidade, variando entre 0% (baixa complexidade) a 100% (alta complexidade) (Provete *et al.*, 2014). A análise da cobertura de dossel será mensurada com densiômetro esférico convexo (%), posicionado à altura do peito (DAP), em quatro pontos Norte, Sul, Leste e Oeste de cada lagoa ou riacho, para as variáveis morfológica. Para as variáveis químicas da água, serão registradas a profundidade (m), temperatura da água (°C), pH e Oxigênio dissolvido (OD mgL⁻¹), alcalinidade (mgL⁻¹), Condutibilidade elétrica (µScm⁻¹) Demanda Química de Oxigênio (DQO mgL⁻¹), Nitrogênio em amônia (mgL⁻¹), nitrito (mgL⁻¹), nitrato (mgL⁻¹) e fosforo total (mgL⁻¹) (APHA, 1998; Sternet *et al.*, 2012;

Ternus *et al.*, 2011). As análises de profundidade, temperatura da água, pH e Oxigênio dissolvido serão aferidas em campo com uso de equipamento multiparâmetro e as demais análises serão realizadas nos laboratórios de Química da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ) e de Análises Ambientais da Universidade do Vale dos Sinos (Unisinos). As amostras serão armazenadas em frascos com tampas e identificadas, em seguida serão acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo. As amostras serão transportadas para o laboratório, onde serão realizadas as análises. Nos laboratórios de Biologia Molecular da Universidade do Vale dos Sinos (Unisinos) e Genética da Unochapecó) serão realizadas a espectrofotometria de absorção atômica de chama, para a determinação da curva de detecção do composto químico “glifosato”.

Análise dos dados

Para calcular a prevalência de infecção será considerada o número de indivíduos positivos para *Bd* em relação ao número de indivíduos amostrados por local. Para mensurar a carga de infecção será considerado o número de equivalente genômicos por espécime. O cálculo será feito multiplicando os valores resultantes do qPCR pelo fator de diluição da extração de DNA.

As análises estatísticas serão realizadas com auxílio do programa *Rstudio*. Será testada a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e observada a homogeneidade das amostras com o teste de Levene. Caso os dados de carga de infecção não forem normais, os valores serão transformados em números logaritmos.

Para comparar a prevalência de infecção entre ambientes lênticos e lóticos, será feito um teste X^2 . Será utilizado o ANOVA Two way para comparar a prevalência e a carga de infecção entre os ambientes lênticos de áreas abertas, e também para comparar a prevalência e carga de infecção entre as espécies de girinos. E será feita uma PCA para analisar quais são os constituintes ambientais que influenciam na prevalência e carga de infecção. Os dados serão apresentados em gráficos e o nível de significância será $P \leq 0.05$ (Zar, 1999).

RESULTADOS ESPERADOS

Com esta pesquisa esperamos encontrar uma relação positiva entre ambientes preservados e a menor prevalência e carga de infecção por *Bd*. E da mesma forma compreender quais são os componentes do micro habitat (químico e morfológico)

utilizado pelos girinos, das diferentes espécies presentes nos ambientes aquáticos que mais contribuem para manter menores prevalências e carga de infecção.

A comparação da prevalência de infecção entre as espécies de girinos, será imprescindível para compreender se a história de vida de espécies especialistas e endêmicas estão mais susceptíveis à infecção por quitridiomiose, permitindo pensar em estratégias de conservação para estas espécies.

O estudo em áreas de florestas e Unidades de Conservação irá nos fornecer subsídios para compreender, se as atividades antrópicas que geram poluição da água, contribuem para a manutenção e disseminação do fungo para o ambiente natural, colocando muitas espécies de anfíbios em risco eminente de infecção. Assim como, alertar sobre os riscos da poluição da água para o ambientes aquáticos e consequentemente, impactando os ecossistemas terrestres. Além de ampliar as informações sobre a quitridiomiose na região sul do Brasil.

CUSTOS DO PROJETO

DISCRIMINAÇÃO	QUANTIDADE	VALOR UNITÁRIO (R\$)	VALOR TOTAL (R\$)
1. Deslocamentos para amostragens em campo.	(6.000 Km ida e volta)	4,50/L	2.700,00
Alimentação referente a 6 incursões de campo com duração de 02 dias, para 02 pessoas.		50,00 p/ pessoa p/ dia	1200,00
2. Despesas com material de campo			
- Pilhas Grandes	5 cartelas c/ 2 unidades	14,90	74,50
- Pilhas Pequenas	30 cartelas c/ 2 unid.	5,50	165,00
- Sacos plásticos	5 rolos c/ 100 unid.	5,00	25,00
- Formol	2 litros	10,00	20,00
- Álcool 92%	40 litros	5,50	220,00
- Frascos para coleta de amostras de água	60 unid	3,50	210,00

3. Despesas com material de laboratório			
- Azul de metileno (25g)	01	25,00	25,00
- PrepMan™	Kit para 200 reações	621,00	621,00
- Álcool Etílico P.A	10 litros	10,00	100,00
- Iniciadores (<i>primers</i>)	3 Caixas com 100 und.	18,00	54,00
- <i>swab</i> estéril	10 caixas	18,00	180,00
- <i>Eppendorf</i>	500 ml	350,00	350,00
- Caixa de luvas descartáveis (M)	Embalagem 100g	18,65	18,65
- Água livre de nucleases	set 100 mM, 4 x 250 µl	320,00	320,00
- Agarose	200 unid.	25,00	5.000,00
- dNTP	20 amostras com análise de 10 indicadores de qualidade de água	30,00	6.000,00
- Serviços de análise em qPCR			
- Serviços de análise de água			
4. Despesas com materiais			
- Impressões e cópias	1000	0,25	250,00
5. Despesas com eventos			
- Participação em eventos para apresentação dos resultados da pesquisa (inscrição, deslocamento, hospedagem e alimentação).			1.000,00
TOTAL			R\$ 18.533,15

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

A pesquisa obedecerá ao seguinte roteiro:

	ANO/MÊS				
	2018	2019	2020	2021	2022

Atividades										
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Estabelecimento de parcerias	X	X	X	X	X					
Coleta de dados em campo	X	X	X	X	X					
Análises de laboratório	X	X	X	X	X	X				
Tabulação e análise dos resultados		X	X	X	X	X				
Qualificação da Tese						X				
Elaboração da Tese			X	X	X	X	X	X	X	X
Submissão de artigo científico para publicação e resumos a eventos científicos da área			X	X	X		X	X		
Defesa da Tese									X	

Referências

ALVARES C. A., J. L. STAPE, P. C. SENTELHAS, J. L. M. GONÇALVES, AND G. SPAROVEK. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, **22**: 711–728. doi: 10.1127/0941-399

BATES, K. A.; CLARE, F. C.; O'HANLON, S.; BOSCH, J.; BROOKES, L.; HOPKINS, K.; MCLAUGHLIN, E. J.; DANIEL, O.; TRENTON, W. J. G.; FISHER, M. C.; HARRISON, X. A. 2018. Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nature Communications*, **9**: 693.

BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, **125**: 271–285.

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. 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 of the United States of America*, **95**: 9031-9036.

BINCKLEY, C. A.; RESETARITS, W. J. 2003. Functional equivalence of non-lethal effects: Generalized fish avoidance determines distribution of gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*, larvae. *Oikos*, **102**: 623–629.

BLAUSTEIN, A.; ROMANSIC J. M.; SCESSELE E. A.; HAN B. A.; PESSIER A. P.; LONGCORE J. E. 2005. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, **19**: 1460–1468.

BLAUSTEIN, A. R.; GERVASI, S. S.; JOHNSON, P. T. J.; HOVERMAN, J. T.; BELDEN, L. K.; BRADLEY, P. W.; XIE, G. Y. 2012. Ecophysiology meets conservation: understanding the role of disease in amphibian population declines. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **367**:1688–1707. doi:10.1098/rstb.2012.0011

BRODMAN, R.; BRIGGLER, J. T. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Ambystoma jeffersonianum* larvae in southern Indiana. *Herpetological Review*, **39**: 320–321.

BUXTON VALERIE L.; SPERRY JINELLE H. 2017. Reproductive Decisions in Anurans: A Review of How Predation and Competition Affects the Deposition of Eggs And Tadpoles. *BioScience*, **67**: 26–38.

CARNAVAL, A. C. O. Q.; PUSCHENDORF, R.; PEIXOTO, O. L.; VERDADE, V. K.; RODRIGUES, M. T. 2006. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth*, **3**: 41-48.

CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proceedings of the Royal Society of London, B: Biological Sciences*, **28**: 20162254.

CATENAZZI, A.; MAY, R. V.; VREDENBURG, V. T. 2013. High prevalence of infection in tadpoles increases vulnerability to fungal pathogen in high-Andean amphibians. *Biological Conservation*, **159**: 413–421.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.11.023>

CHASE, J. M.; AMARASEKARE, P.; COTTENIE, K.; GONZALEZ A.; HOLT R. D.; HOLYOAK, M.; HOOPES, M. F.; LEIBOLD, M. A.; LOREAU, M.; MOUQUET, N.; SHURIN, J. B.; TILMAN, D. 2005. Competing theories for competitive metacommunities. In HOLYOAK, M.; LEIBOLD, M. A.; HOLT, R. D. (eds), *Metacommunities: Spatial Dynamics and Ecological Communities*. *Chicago University Press, Chicago*: 335–354.

CHESSON, P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**: 343–366.

CONTE, C. E.; ROSSA-FERES, D. C. 2007. Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros em um remanescente de Floresta de Araucária no sudeste do Paraná. *Rev Bras Zoo*, **24**: 1025-1037.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, **9**: 141–150.

DRAKE, D. L.; ALTIG, R.; GRACE, J. B.; WALLS, S. C. 2007. Occurrence of oral deformities in larval anurans. *Copeia*, **2**: 449–458.

FISCHER, M. C. 2008. Molecular toolkit unlocks life-cycle of the panzootic amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 17209–17210.

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

GARNER, T. W. J.; GARCIA, G.; CARROLL, B.; FISHER, M. C. 2009. Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis Aquat Org*, **83**:257-260.
<https://doi.org/10.3354/dao02008>

GERVASI S. S., J. URBINA, J. HUA, T. CHESTNUT, R. A. RELYEA, AND A. R. BLAUSTEIN. 2013. Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth*, **10**: 166–171. doi: 10.1007/s10393-013-0832-8

GOSNER K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 18.

GONÇALVES, D. D. S. 2014. Diversidade e chave de identificação para girinos ocorrentes em áreas de floresta com araucária. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. UFPR, Curitiba.

GREENBERG, D. A.; PALEN, W. J.; MOOERS, A. Ø. 2017. Amphibian species traits, evolutionary history and environment predict *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns, but not extinction risk. *Evolutionary Applications*, **10**: 1130–1145.

GREENSPAN, S. E.; LAMBERTINI, C.; CARVALHO, T.; JAMES, T. Y.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; BECKER, C. G. 2018. Hybrids of amphibian chytrid show high virulence in native hosts. *Scientific Reports*, **8**: 9600. DOI:10.1038/s41598-018-27828-w

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *Bioscience*, **55**: 207-217.
<http://dx.doi.org/10.1641/0006-3568>.

- HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. 2013. Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology. *Anolis Books*, São Paulo.
- HAN, B. A., SCHMIDT, J. P., BOWDEN, S. E.; DRAKE, J. M. 2015. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**: 7039–7044.
- HAYES, T. B; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, **213**(6): 921-933.
- JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65**: 181–186.
- JOHNSON, P. T. J.; ROHR, J. R.; HOVERMAN, J. T.; KELLERMANN, E.; BOWERMAN, J.; LUNDE, K. B. 2012. Living fast and dying of infection: Host life history drives interspecific variation in infection and disease risk. *Ecology letters*, **15**: 235–242.
- KADEKARU, S.; UNE, Y. 2018. Comparison of methods for detection of chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in bullfrog tadpole mouthparts. *J. Vet. Med. Sci.*, **80**(2): 260–262. doi: 10.1292/jvms.17-0071
- KNAPP, R. A.; MORGAN, J. A. T. 2006. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia*, **2**: 188–197.
- KOPRIVNIKAR, J.; GIBSON, C. H.; REDFERN, J. C. 2012. Infectious personalities: behavioural syndromes and disease risk in larval amphibians. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **279**: 1544–1550.
- KOLBY, J. E.; RAMIREZ, S. D.; BERGER, L.; RICHARDS-HRDLICKA, K. L.; JOCQUE, M.; SKERRATT, L. F. 2015. Terrestrial dispersion and potential environmental transmission of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *PLoS ONE*, **10**: e0125386.
- KRYNAK, K. L.; BURKE, D. J.; BENARD, M. F. 2016. Landscape and water characteristics correlate with immune defense traits across Blanchard's cricket frog (*Acris blanchardi*) populations. *Biological Conservation*, **193**: 153–167.
- KRIGER, K. M.; HERO, J. M. 2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions*, **13**: 781–788.
- LIPS, K. R. 1999. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. *Conservation Biology*, **13**(1): 117–125.

- LIPS, K. R.; BREM, F.; BRENES, R.; REEVE, J. D.; ALFORD, R. A.; VOYLES, J.; CAREY, C.; LIVIO, L.; PESSIER, A. P.; COLLINS, J. P. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**: 3165–3170.
- LIPS, K. R.; Diffendorfer, J.; Mendelson, J. R.; Sears, M. W. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology*, **6**: e72.
- LIPS, K. R. 2016. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **371**: 20150465.
- LIU, X.; ROHR, J. R.; LI, Y. 2013. Climate, vegetation, introduced hosts and trade shape a global wildlife pandemic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**(1753): 20122506
- MACHADO, I. F.; MALTCHIK, L. 2007. Check-list of diversity of anurans in Rio Grande do Sul (Brazil) and a classification propose for larvals forms. *Neotropical Biology and Conservation*, **2**(2): 101-116.
- MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. 1999. Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. *The University of Chicago Press, Chicago*.
- MARTEL, A.; ADRIAENSEN, C.; SHARIFIAN-FARD, M.; SLOUIJS, A. S. V. D.; LOUETTE, G.; BAERT, K.; CROMBAGHS, B.; DEWULF, J.; PASMANS, F. 2013. The absence of zoonotic agents in invasive bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in Belgium and the Netherlands. *EcoHealth*, **10**: 344–347.
- MELO, L. S. O.; GONÇALVES-SOUZA, T.; GAREY, M. V.; CERQUEIRA, D. 2017. Tadpole species richness within lentic and lotic microhabitats: An interactive influence of environmental and spatial factors. *Herpetological Journal*, **27**(4): 339-345
- MESQUITA, A. F. C.; LAMBERTINI, C.; LYRA, M.; MALAGOLI, L. R.; JAMES, T. Y.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; BECKER, C. G. 2017. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. *Scientific Reports*, **7**: 16605.
- MITTERMEIER R. A., G. A. B. FONSECA, A. B. RYLANDS, AND K. BRANDON. 2005. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. *Conservation Biology*, **19**: 601-611. doi: 10.1111/j.1523-1739.2005.00709.x
- MINER, B. G.; SULTAN, S. E.; MORGAN, S. G.; PADILLA, D. K.; RELYEA, R. A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 685–692.
- NAVARRO-LOZANO, A.; SANCHEZ-DOMENE, D.; ROSSA-FERES, D. C.; BOSCH, J., SAWAYA, R. J. 2018. Are oral deformities in tadpoles accurate indicators of anuran chytridiomycosis? *PLoS ONE*, **13**(1): e0190955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190955>

- O'HANLON, S. J.; RIEUX, A.; FARRER, R. A.; ROSA, G. M.; WALDMAN, B.; BATAILLE, A.; KOSCH, T. A.; et al. 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, **360**: 621-627.
- OLSON, D. H.; RONNENBERG, K. L. 2014. Global *Bd* Mapping Project: 2014 Update. *FrogLog*, **22**, 17–21.
- PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C. 2004. Anuran tadpole assemblages in riparian areas of the middle Paraná River, Argentina. *Biodiversity and Conservation*, **13**: 1833-1842. <http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOC.0000035870.36495.fc>
- PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, S. L.; LONGCORE, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96**: 9–15.
- PIOVIA-SCOTT, J.; POPE, K. L.; LAWLER, S. P.; COLE, E. M.; FOLEY, J. E. 2011. Factors related to the distribution and prevalence of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Rana cascadae* and other amphibians in the Klamath Mountains. *Biol. Conserv.*, **144**: 2913–2921.
- PROVETE, D. B.; GONÇALVES-SOUZA, T.; GAREY, M. V.; MARTINS, I. A.; ROSSA-FERES, D. C. 2014. Broad-scale spatial patterns of canopy cover and pond morphology affect the structure of a Neotropical amphibian metacommunity. *Hydrobiologia*, **734**, 69-79.
- PRIMON, E. A.; ARANTES, S. A. C. M.; SABINO, D. C. C.; AFINOVICZ, W. A. 2013. Efeito da interação Glifosato e Fósforo sobre a população de bactérias do solo na Amazônia Meridional. *27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Natal-RN*, **1101-1**.
- RACHOWICZ, L. J.; VREDENBURG, V. T. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, **61**: 75-83.
- ROWLEY, J. J. L.; ALFORD, R. A. 2007. Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, **677**: 1–9.
- RUGGERI, J.; TOLEDO, L. F.; CARVALHO-E-SILVA, S. P. 2018. Stream tadpoles present high prevalence but low infection loads of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota). *Hydrobiologia*, **806**: 303–311. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3367-0>
- SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; RIBEIRO, L. R.; RIZZI, G. M.; MEDICO, S. E. D.; RISSOLI, R. Z.; VIEIRA, C. A.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; LEITE, D. S.; ADDALLA, F. C.; TOLEDO, L. F.; COSTA, M. J. 2015. Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. *Journal of Experimental Zoology A*, **323**: 487–496.
- SANTOS, R. C.; DE BASTIANI, V. I. M.; RIBEIRO, L. P.; PONTES M. R.; SILVA LEITE, D.; TOLEDO, L. F.; SOUZA FRANCO, G. M.; LUCAS, E. M. No prelo. High

prevalence and low intensity of infection by the Chytrid Fungus in rainforest bullfrog populations in southern Brazil.

SANTOS, T. G.; ROSSA-FERES, D. C.; CASATTI, L. 2007. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia, Serie Zoologica*, **97**: 37-49.

SCHAR, C.; VIDALE, P. L.; LÜTHI, D.; FREI, C.; HÄBERLI, C.; LINIGER, M. A.; APPENZELLER, C. 2004. The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature*, **427**: 332–336.

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.; DAVIES, A. J.; CUOMO, C. A.; DASZAK, P.; JAMES, T. Y. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, **21**: 5162- 5177.

SEARLE, C. L.; BIGA, L. M.; SPATAFORA, J. W.; BLAUSTEIN, A. 2011. A dilution effect in the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(39): 16322–16326.

SIMPKINS, C. A.; KRIGER, K.; HERO, J-. M. 2017. Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* on amphibians from low pH, oligotrophic waterbodies. *Herpetological Review*, **48**(4): In press.

SKELLY, D. K.; WERNER, E. E.; CORTWRIGHT, S. A. 1999. Longterm distributional dynamics of a michigan amphibian assemblage. *Ecology*, **80**: 2326–2337.

SMITH, K. G.; WELDON, C.; CONRADIE, W.; PREEZ, L. H. 2007. Relationships among size, development, and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in African tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74**(2): 159–64.

SONN J. M.; BERMAN, S.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L. 2017. Influence of temperature on chytridiomycosis in vivo. *EcoHealth*, **14**: 762-770. doi: 10.1007/s10393-017-1269-2

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2008. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005. <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>.

STENERT, C.; BACCA, R. C.; MORAES, A. B.; A´VILA, A. C.; MALTCHIK, L. 2012. Negative effects of exotic pine invasion on macroinvertebrate communities in southern Brazil coastal ponds. *Marine and Freshwater Research*, **63**: 283–292.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, L.; WALLER, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, **306**(5702): 1783-1786.

- TOLEDO, L. F.; BRITTO, F. B.; ARAÚJO, O. G. S.; GIASSON, L. M. O.; HADDAD, C. F. B. 2006. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology*, **1**(3): 185-191.
- TERNUS, R. Z.; SOUZA-FRANCO, G. M.; ANSELMINI, M. E. K.; MOCELLIN, D. J. C.; DAL MAGRO, J. 2011. Influence of urbanisation on water quality in the basin of the upper Uruguay River in western Santa Catarina, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, **23**(2): 189-199.
- VALENCIA-AGUILAR, A.; TOLEDO, L. F.; VITAL, M. V.; MOTT, T. 2016. Seasonality, environmental factors, and host behavior linked to disease risk in stream-dwelling tadpoles. *Herpetologica*, **72**: 98–106.
- VIEIRA, C. A.; TOLEDO, L. F.; LONGCORE, J. E.; LONGCORE, J. R. 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.; CAMPBELL, 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.
- WARNE, R. W.; KARDON, A.; CRESPI, E. J. 2013. Physiological, Behavioral and Maternal Factors That Contribute to Size Variation in Larval Amphibian Populations. *PLoS ONE*, **8**(10): e76364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076364>
- WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(1): 11466–11473.
- WELLS, K. D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. *University of Chicago Press*.
- WERNER, E. E.; SKELLY, D. K.; RELYEA, R. A.; YUREWICZ, K. L. 2007. Amphibian species richness across environmental gradients. *Oikos*, **116**: 1697–1712.
- WOODHAMS, D. C.; ALFORD, R. A.; BRIGGS, C. J.; JOHNSON, M.; ROLLINS-SMITH, L. A. 2008. Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology*, **89**:1627–1639.
- ZAR J. H. 1999. Biostatistical analysis. *Pearson Education India*, 746.