

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

Projeto de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Investigação da presença de fungos e vírus letais em espécies do gênero

***Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae)**

Candidata: MSc. Mariana Retuci Pontes

Orientador: Prof. Dr. Luís Felipe Toledo

Coorientadora: Dra. Joice Ruggeri Gomes

Colaborador: Prof. Dr. Marcio Borges Martins

Instituição: UNICAMP – Univ. Estadual de Campinas – Instituto de Biologia, Laboratório de História Natural dos Anfíbios Brasileiros (LaHNAB).

Campinas, 2019

Resumo

As doenças infecciosas emergentes estão entre os principais fatores que ameaçam a biodiversidade do mundo, sendo o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e o *Ranavirus* (Rv) os maiores responsáveis pelo declínio de populações de anfíbios. Ambos são agentes patogênicos transmitidos pela água ou pelo contato entre indivíduos, o que torna a dispersão extremamente eficaz. Apesar de haver registros de casos de coinfecção por Bd e Rv em populações nativas de anfíbios nas Américas e Europa, no Brasil não há estudos sobre a presença do ranavírus e a sua interação com o Bd em espécies de anfíbios ameaçadas de extinção. As espécies do gênero ameaçado *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae) ocorrem, em sua maioria, na região sul da América do sul, onde tanto o fungo quanto o vírus já foram detectados. Sabendo que fatores ambientais afetam a dinâmica da quitridiomicose e ranavirose na natureza, este projeto tem como objetivo investigar a presença e interação dos dois agentes patogênicos Rv e Bd em anuros do gênero *Melanophryniscus* na Mata Atlântica Sul do Brasil. Por meio de técnicas moleculares para a detecção desses agentes patogênicos, este trabalho visa esclarecer os padrões de infecção por Bd e Rv em *Melanophryniscus* na natureza, utilizando variáveis ambientais como preditoras das infecções por um ou ambos os patógenos. Os resultados encontrados neste trabalho serão discutidos a fim de auxiliar nos planos de manejo para conservação das espécies e contribuir para atualização do status de conservação dos anfíbios deste projeto.

Palavras-chave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Ranavirus*, quitridiomicose, ranavirose, espécies ameaçadas, Mata Atlântica brasileira.

1. Introdução e justificativa

Doenças infecciosas causadas por diversos agentes patogênicos são uma das maiores ameaças a biodiversidade e aos ecossistemas saudáveis no mundo (Daszak et al. 2000, Daszak et al. 2013, Fisher et al. 2012, Scheele et al. 2019). A quitridiomicose, doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Longcore et al. 1999), contribuiu para declínios populacionais de anfíbios todo o mundo, sendo considerada a doença que causou a maior perda de biodiversidade já registrada (Scheele et al. 2019). Outra doença infecciosa com distribuição global já relacionada com o declínio de populações de anfíbios é a ranavirose, cujo agente patogênico é o *Ranavirus* (Rv) (Miller et al. 2011, Price et al. 2014, Earl et al. 2016, Schloegel et al. 2010a, OIE 2019). As ranaviroses são causadas por espécies do gênero *Ranavirus* que afetam vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) e, assim como o Bd, já foi diagnosticado em diversas espécies de anuros e salamandras (Miller et al. 2011, Sutton et al. 2015).

Acredita-se que o Bd e o Rv sejam os principais condutores de declínios populacionais de anfíbios relacionados a doenças (Berger et al. 1998, Daszak et al. 2000, Grant et al. 2016). Casos de coinfeção por estes agentes patogênicos já foram registrados em populações nativas de anfíbios nas Américas e Europa, sugerindo que a coinfeção por Bd e Rv indivíduos pode ser comum (Whitfield et al. 2013, Reshetnikov et al. 2014, Warne et al. 2016). No Brasil, o estudo com Rv esteve, por muito tempo, restrito a ranários (produção comercial de *Lithobates catesbeianus*) (Galli et al. 2006, Mazzoni et al. 2009), e somente recentemente foi registrado a presença desse vírus em ambiente natural na Mata Atlântica Sul (Ruggeri et al. 2019). Portanto, ainda não são conhecidos a distribuição ou o efeito desse patógeno em populações naturais de anuros nativos do Brasil, e possíveis casos de coinfeção poderiam ser ainda mais preocupantes frente aos possíveis declínios populacionais. A dinâmica do Bd em anuros de ambientes naturais já foi estudada (Kriger et al. 2007, Longo et al. 2010, Becker & Zamudio 2011, Stevenson et al. 2013, Ruggeri et al. 2015), assim, é crucial entender também a dinâmica do Rv identificar

possíveis casos de coinfecção em anuros no Brasil. Desta forma, o entendimento sobre quais fatores interferem na dinâmica destes dois agentes infecciosos em anuros é importante para a conservação das espécies, em especial aquelas já ameaçadas de extinção. Este é o caso de diversas espécies do gênero *Melanophryniscus*, pertencente à família Bufonidae.

O gênero *Melanophryniscus* é composto por 29 espécies com distribuição limitada ao sul da América do Sul (Frost, 2019). Deste total, 22 espécies ocorrem no Brasil (Frost, 2019, Segalla et al. 2019), sendo que 8 estão classificadas em alguma categoria de ameaça (Fundação Zoobotânica 2014, IUCN Red List 2019, Haddad et al. 2013, ICMBio/MMA 2018). No Brasil, as espécies ocorrem nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e apresentam três diferentes estratégias de ovoposição: em poças temporárias, pequenos riachos temporários e micro corpos d'água (bromélias) (Baldo et al. 2014). Apesar desta riqueza, as populações das espécies deste gênero serão afetadas pelas mudanças climáticas, principalmente pela diminuição das áreas climáticas (Zank et al. 2014).

No Brasil, a maioria das espécies de *Melanophryniscus* ocorrem na região sul, onde está localizado grande parte dos ranários brasileiros (Both et al. 2011). A região Sul do Brasil é conhecida por apresentar uma grande quantidade de populações ferais da rã touro (ref) que escaparam de ranários (Both et al. 2011). Além disso, estes ambientes de criação de rã, são responsáveis por liberar grande quantidade de zoósporos de Bd em ambientes naturais (Ribeiro et al. 2019). Já foi detectado mortalidade em massa de girinos de rãs por causa da Rv em ranários no Brasil (ref), sendo este tipo de comércio um possível responsável por introduzir o vírus em ambientes naturais. Ainda, a rã-touro (*L. catesbeianus*) é tolerante aos agentes patogênicos causadores da quitridiomicose e da ranavirose, podendo atuar como vetor de ambos (Daszak et al. 2004, Mazzoni et al. 2009, Schloegel et al. 2010a, 2010b) e, consequentemente, como facilitador da introdução dessas doenças em populações suscetíveis (Lesbarrères et al. 2011, Kolby et al. 2014).

Recentemente, um estudo mostrou que as espécies da família Bufonidae parecem ser desproporcionalmente sensíveis aos impactos do Bd, tendo sido a família que mais sofreu declínios relacionados à quitridiomicose, com 28 espécies passíveis de serem extintas (>90 % de chances), 30 espécies presumidamente extintas e 3 espécies já extintas (Scheele et al. 2019).

Características relacionadas ao clima e outros fatores ambientais afetam a dinâmica da quitridiomicose e da ranavirose (Kiesecker et al. 2001, Carey & Alexander 2003, Daszak et al. 2005, Lips et al. 2008,). Desta forma, fatores ambientais similares podem gerar surtos de doenças causadas por patógenos e levar a declínios de populações. Fatores bióticos, como por exemplo o estágio de vida do anuro, a riqueza de espécies da comunidade, a linhagem dos patógenos, ou os tipos de nichos especializados, influenciam no risco de infecção tanto por Bd quanto por Rv (Brunner et al. 2005, Searle et al 2011, Becker et al 2014, Becker & Zamudio 2011, Araujo et al. 2016, Greenspan et al. 2018).

Sabe-se que o Bd está amplamente distribuído na Mata Atlântica (James et al. 2015, Carvalho et al. 2017) e pelo menos três linhagens diferentes desse fungo (Bd-ASIA-2/BdBRAZIL, Bd-GPL e Bd-Hybrid) já foram detectadas em espécies nativas no Brasil : Schloegel et al. 2012; Jenkinson et al. 2016). Porém, em relação ao Rv, não há informações sobre qual a estirpe está presente nos anuros nativos da Mata Atlântica, e se existe mais de uma estirpe. Entretanto, a estirpe já diagnosticada em ranários foi muito semelhante a linhagem FV3 (Mazzoni, 2009), a qual poderia ser a mesma encontrada em anuros nativos caso a rã-touro tenha sido responsável pela introdução desse patógeno na natureza.

As lacunas de conhecimento sobre estes dois agentes infecciosos no Brasil ainda são grandes, principalmente em relação ao Rv. Não há nenhum registro de Rv em espécies de *Melanophryniscus* no Brasil, e somente uma espécie do gênero foi diagnosticada com a presença do fungo (Sluys et al. 2007). Desta forma, estudos que ampliem o conhecimento sobre estes dois patógenos em anuros brasileiros e ameaçados de extinção se tornam essenciais para elaboração de medidas mitigatórias e planos de manejos. A identificação, caracterização e a

avaliação contínua de novos patógenos de anfíbios é necessária para entender o papel que os agentes infecciosos desempenham nos declínios de anuros pelo mundo. Além disso, as informações sobre patógenos neste grupo de anuros podem contribuir para o estabelecimento do status de conservação das espécies do gênero *Melanophryniscus*. A escolha da região Sul do Brasil para a realização deste estudo se deve ao fato desta região apresentar a maior parte das população de *Melanophryniscus* ameaçados do Brasil, e por ser uma região com abundância de populações invasoras de rã-touro (Both et al. 2011, Both et al. 2014), o que pode contribuir no aumento da prevalência de ambos os patógenos.

O objetivo desse trabalho é investigar a presença e a interação dos agentes patogênicos Rv e Bd em anuros do gênero *Melanophryniscus* do sul da Mata Atlântica brasileira, buscando entender como variáveis bióticas e abióticas influenciam as taxas de infecção. Dentro desse contexto, destacam-se quatro hipóteses a serem testadas: 1) o Rv e o Bd estão presentes em anuros do gênero *Melanophryniscus*, sendo a dinâmica de infecção sazonal e os fatores bióticos e abióticos influenciam nas taxas de infecção; 2) o Bd e o Rv estão amplamente distribuídos em anuros do gênero *Melanophryniscus* e indivíduos infectados pelos dois agentes patogênicos apresentam altas cargas de infecção; 4) o tipo de habitat reprodutivo influencia na prevalência e na carga de infecção por Bd e Rv; 5) existe mais de uma linhagem de Bd infectando anuros do gênero *Melanophryniscus*, e a estirpe de Rv é a FV3-like, assim como a previamente detectada em ranários no Brasil. Esse estudo será dividido em três capítulos complementares.

2. Métodos

Espécies focais e área de estudo

Espécies com reprodução em ambiente lântico (ambientes aquáticos de água parada):

Melanophryniscus adimirabilis: a única população conhecida está localizada há 60 km da localidade positiva para Rv em girinos nativos (Ruggeri et al. 2019). A população ocorre no município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul (28°51'00.0"S, 52°18'00.0"W). Os adultos

capturados terão as manchas ventrais fotografadas para posterior foto-identificação (Bardier et al. 2017) a partir da utilização do software Wild-ID (Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, USA). Esse programa permite calcular a similaridade entre as fotografias para que possamos identificar recapturas dos indivíduos da espécie (Abadie 2012; Caorsi et al. 2012; Elgue et al. 2014).

Melanophryniscus dorsalis: Morro dos Conventos, Araranguá, Santa Catarina (28°56'35.3"S, 49°21'42.1"W), Parque Estadual de Itapeva (PEVA), Torres, Rio Grande do Sul (29°20'00"S, 49°43'00"W), Ilha dos Marinheiros, Rio Grande, Rio Grande do Sul (27°24'24.3"S, 51°13'14.0"W).

Melanophryniscus devincenzii: Parque Natural Municipal de Sertão, Sertão, Rio Grande do Sul (28°02'31"S, 52°13'28"W), Campos Novos, Santa Catarina (27°24'24.3"S, 51°13'14.0"W), e Passos Maia, Santa Catarina (26°46'52.3"S, 52°03'38.3"W).

Espécies com reprodução em ambiente lótico (ambientes aquáticos de água corrente):

Melanophryniscus tumifrons: Morungava, Gravataí (29°56'09.0"S, 51°00'59.0"W), São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul (29°26'31.5"S, 50°35'09.0"W), e Biturana, Paraná (26°09'19.2"S, 51°33'05.4"W).

Melanophryniscus simplex: Bom Jardim da Serra, Santa Catarina (28°20'00"S, 49°38'00"W)

Melanophryniscus spectabilis: Nova Teutônia, Seara, Santa Catarina (27°09'00"S, 52°25'00"W)

Espécies com reprodução em bromélias:

Melanophryniscus alipioi: Serra do Capivari, Campina Grande do Sul, Paraná (25°07'49.0"S, 48°49'16.9"W)

Melanophryniscus biancae: Serra do Quiriri, Garuva, Santa Catarina (26°01'42.0"S, 48°57'54.0"W).

Melanophryniscus vilavelhensis: Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná (25°14'41.1"S, 50°01'18.3"W).

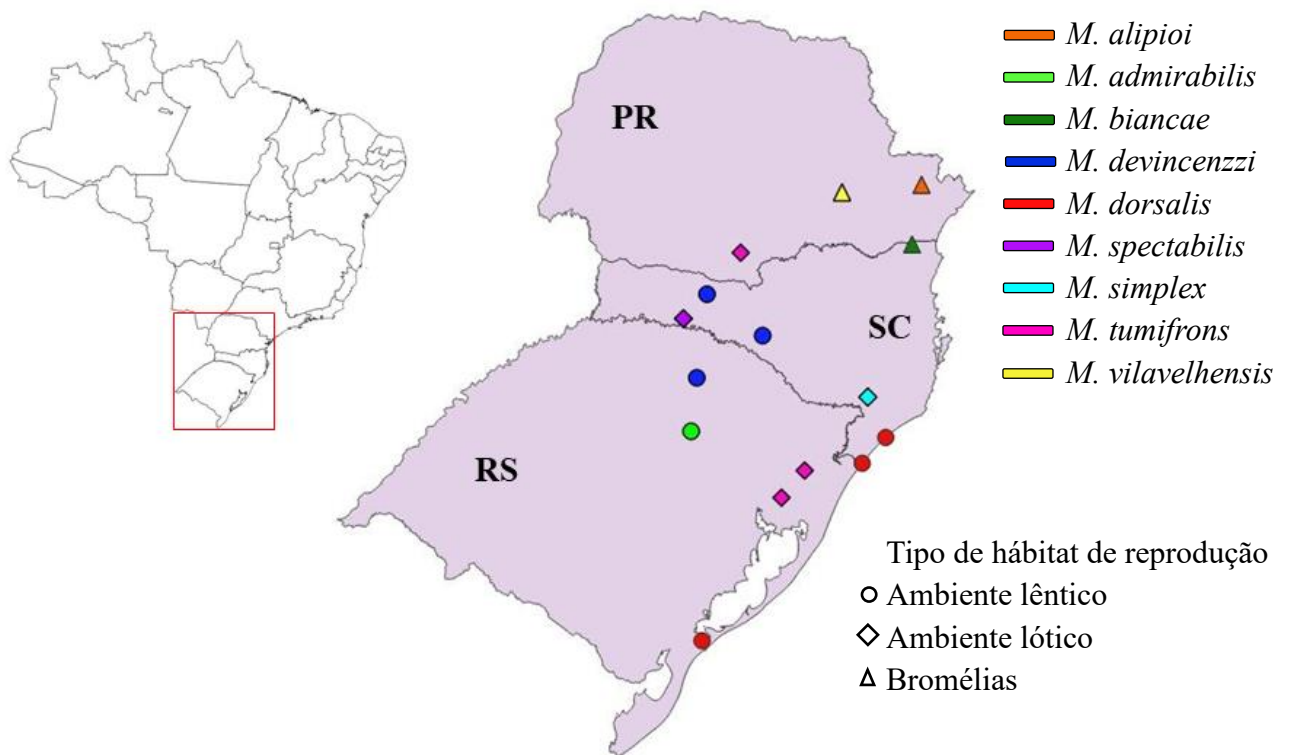


Figura 1. Pontos de coleta das espécies de *Melanophryniscus* na região sul do Brasil.

Caracterização do ambiente

Serão registrados os seguintes fatores abióticos dos locais de coleta: temperatura do corpo d'água (termo-higrômetro), temperatura do ar (obtenção de dados da estação meteorológica mais próxima ou termo-higrômetro), pluviosidade (estação meteorológica mais próxima), e cobertura do dossel (densiômetro).

Coleta de anuros

A coleta será realizada em pelo menos duas populações de cada espécie. Iremos utilizar a procura visual e auditiva para encontrar indivíduos adultos e a procura visual para encontrar girinos. Para evitar contaminação cruzada entre as amostras, cada indivíduo será manipulado com um par de luvas descartáveis. Os animais serão colocados em sacos individuais e para os adultos, será utilizado um cotonete esteril (*swab*) para coletar material micótico da superfície

da pele e diagnosticar a infecção por Bd. A passagem do swab na pele no anuro será realizada seguindo o protocolo de Lambertini et al. (2013) e cada swab será alocado em um criotubo de 1,5 ml e armazenados a -20 °C. Para cada espécime, o material utilizado será esterilizado antes de ser usado para evitar a contaminação cruzada. Os girinos serão coletados com auxílio de peneiras. Os locais específicos de coleta são citados em 2. Métodos. Os métodos de anestesia e morte dos girinos seguirão a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos (Concea) e estão em processo de análise no Comitê de Ética no Uso de Animais da Unicamp (CEUA), bem como a autorização de coleta do SISBio, do IAP, SEMA e IMA. Os adultos serão capturados e liberados e os girinos serão coletados e levados para o laboratório para realização de análises moleculares.

Os Indivíduos capturados terão seus comprimentos rostro-cloacal (CRC) medidos (paquímetro digital de 0,01 mm de precisão). A massa corpórea será medida com uma balança de precisão (Pesola de precisão de 0,1 g.). Com estes dados será possível obter a condição corporal de cada indivíduo através do Índice de Massa Escalar (IME) (Peig & Green 2009). O IME será calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IME} = M_i \left[\frac{L_0}{L_i} \right]^{b_{\text{SMA}}}$$

Onde, IME = Índice de Massa Escalar; M_i = massa corporal individual; L_0 = valor médio do comprimento rostro-cloacal da população; L_i = comprimento rostro-cloacal individual; b_{SMA} = valor da inclinação dos quadrados mínimos ordinários (OLS), dividido pelo coeficiente r da Correlação de Pearson entre massa e CRC. O b_{SMA} será calculado usando um software online (Bohonak & van der Linde, 2004).

DNA ambiental (eDNA)

Quando não for possível a coleta de girinos, serão coletadas quatro amostras de 250 ml água do local de estudo, exceto no caso das bromélias. As amostras serão misturadas e será

feito a filtração de 250 ml. Esta técnica consiste em detectar fragmentos de DNA presentes no ambiente por meio da utilização de uma bomba à vácuo (a quantidade de 250 ml já foi testada e se mostrou eficaz para Rv: J. Ruggeri, dados não publicados).

Análises moleculares

Batrachochytrium dendrobatidis

Para a detecção de Bd nos anuros será feita a coleta do disco oral de girinos (Boyle et al. 2004) e células da pele dos indivíduos adultos (*swab*). A extração de DNA de Bd de cada amostra será feita utilizando Prepman Ultra® (Life Technologies) e uma vez extraídas, as amostras de DNA serão armazenadas em freezer a -80 °C até a análise molecular. Para diagnóstico e quantificação de zoósporos de Bd, será utilizada a técnica de qPCR com adição de *primers* específicos para a amplificação do DNA (ITS1-3 Chytr e 5,8S Chytr). Esta técnica utiliza Taqman® qPCR Assay (Life Technologies) seguindo o protocolo de Boyle et al. (2004) com modificações de Lambertini et al. (2013). Serão considerados positivos as amostras com 1 > equivalentes genômicos de zoósporos (Kriger et al. 2007).

Ranavirus

Para detecção e quantificação de Rv nos indivíduos será coletado fígado, baço e rins dos girinos. As amostras serão mantidas em 1 ml de DNAzol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) até o momento da extração. O DNA dos tecidos será extraído utilizando o protocolo de extração dos fabricantes de DNAzol®. O produto da extração de DNA dos órgãos será quantificado no fluorômetro Qubit 4 (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) para determinar a concentração de DNA dupla fita em cada amostra. Posteriormente, as amostras serão diluídas para uma concentração final de 7,5 ng/µL, e testadas para a presença do ranavírus seguindo o protocolo de Allender et al. (2013). O diagnóstico e quantificação de Rv nas amostras será feito utilizando o TaqMan qPCR Assay (Life Technologies) (Allender et al. 2013), com a adição de *primers* específicos para amplificação do DNA do vírus (forward

AACGCCGACCGAAAACCTG e reverse GCTGCCAAGATGTCGGGTAA). A reação do qPCR terá dois controles positivos para Rv, dois controles negativos (água) e dois controles negativos da extração. Cada amostra será testada em duplicata. Serão consideradas positivas aquelas amostras em que ambas as duplicatas amplificarem antes da média do C_t entre os dois controles positivos. Cada reação de qPCR terá o ΔR_n (threshold) ajustado manualmente para 0,168 para que a reação seja comparável à curva padrão, sendo possível assim, calcular a quantidade de cópias virais em cada amostra positiva.

DNA ambiental

O DNA presente na membrana de filtração será extraído utilizando o Prepman Ultra®, e posteriormente será purificado com *spin columns* (Qiagen Inc.), seguindo os protocolos dos fabricantes. A amostra será então testada separadamente para a presença de Bd e de Rv seguindo os protocolos de detecção para cada patógeno (Boyle et al. 2004; Allender et al. 2013).

Genotipagem

O diagnóstico de presença ou ausência de Rv foca na amplificação do gene da proteína principal do capsídeo (MCP). Porém, a maioria das espécies de Rv apresenta mais de 90% de similaridade sequencial na região do MCP. Desta forma, para determinar a(s) estirpe(s) do vírus amostrado, vamos sequenciar o DNA do Rv detectado nas amostras positivas para ver se existe mais de uma estirpe na região sul do Brasil e entender sua distribuição. Para o sequenciamento das amostras de Rv, será feito uma nova parceria com o laboratório do Prof. Dr. Trenton W. J. Garner (Institute of Zoology, Zoological Society of London – UK) e com o pesquisador Dr. Stephen J. Price (UCL Genetics Institute, Darwin Building, Gower Street, London – UK). Para a genotipagem serão utilizados os amplicons oriundos do produto de PCR, que serão limpos e sequenciados.

Em relação ao Bd, realizaremos o sequenciamento a partir de amostras positivas que apresentarem taxa de infecção superior a 150 equivalentes genômicos de zoósporos), seguindo o protocolo de Byrne et al. (2017), com ampliação de 192 regiões genômicas.

Os dados obtidos com o sequenciamento de ambos os patógenos possibilitará avaliar o padrão de distribuição entre as diferentes cepas de Bd encontradas e as estirpes de Rv.

3. Apresentação dos capítulos

CAPÍTULO I – Sazonalidade de infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* e *Ranavirus* em *Melanophryniscus. admirabilis* (Anura: Bufonidae)

Hipótese: A população de *Melanophryniscus. admirabilis* (sapinho-admirável-de-barriga-vermelha) está infectada com Bd e Rv e existe um padrão sazonal de infecção por estes agentes infecciosos. O local onde a população de *M. admirabilis* fica em um fragmento do Mata Atlântica, há 60 km da localidade onde o único registro de Rv em ambiente natural foi feito. Ainda, já foi visualizado a presença da espécie *Lithobates Catesbeianus* (rã-touro), uma espécie sugerida por ser vetor dos agentes patogênicos Bd e Rv, próximo ao local (M.B. Martins, comunicação pessoal). Assim, acreditamos que a espécie apresentará ambos agentes patogênicos, e que haverá sazonalidade destas taxas de infecção, assim como encontrado em *M. montevidensis* (M.R. Pontes, dados não publicados)

Método: Serão realizadas quatro campanhas de coleta, sendo duas durante a primavera e duas durante o outono. Este período foi escolhido pois os indivíduos da população estão em período reprodutivo e são encontrados com maior facilidade (Di-Bernado et al. 2006). Serão coletados swabs de 30 indivíduos adultos além de 30 girinos por campanha. Os girinos serão testados para Bd e Rv, enquanto os adultos somente para Bd. Os adultos serão fotografados para posterior foto-identificação dos indivíduos recapturados.

Análises dos resultados: todas as análises estatísticas serão realizadas na plataforma R (R Core Team 2018) com o auxílio de pacotes específicos para análises de dados. Para testar as diferenças da prevalência e carga de infecção por Bd e Rv entre a primavera e outono será feito o teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA (dependendo da normalidade da distribuição dos dados amostrais obtidos), seguido por um teste *a posteriori*.

Para testar se existe relação entre carga de infecção por Bd e Rv, será feito uma correlação de Pearson. Para determinar a capacidade preditiva das variáveis abióticas e bióticas na prevalência de infecção pelo Bd e Rv nas populações estudadas, será ajustado um Modelo Linear Generalizado (GLM). No caso da carga de infecção por Bd e Rv, será ajustado um Modelo Linear Múltiplo (MLM), para determinar a capacidade das variáveis abióticas e bióticas em explicar as cargas de ambos os patógenos. Para evitar a multicolinearidade entre as variáveis a serem testadas, será feito uma correlação de Pearson para um $|r| > 0,7$, utilizando a função `select07` (Método “select07” de Dormann et al. 2013, R Core Team 2018). Para avaliar se os valores de condição corporal são diferentes entre os animais infectados pelos patógenos e não infectados, será feito o U-teste de Mann-Whitney (em caso de anormalidade dos dados) e teste t (em caso de normalidade). O teste de Wilcoxon ou teste t pareado será usado para testar a diferença nos valores de intensidade de infecção por Bd e Rv dos indivíduos recapturados. O mesmo teste será feito para estabelecer se os valores de condição corporal (IME) dos indivíduos capturados se diferem dos valores da recaptura.

CAPÍTULO II – Influência do habitat reprodutivo na interação entre *Batrachochytrium dendrobatidis* e Ranavirus em anuros do gênero *Melanophryniscus*

Hipótese: A prevalência e carga de infecção dos agentes infecciosos Bd e Rv em populações de anuros do gênero são diferentes de acordo com o tipo de habitat reprodutivo, sendo que as espécies que se reproduzem em ambientes lótico e em bromélias apresentarão maior prevalências de infecção, porém os indivíduos terão baixos valores de infecção. Enquanto as

espécies de ambiente lântico, terão uma prevalência baixa, mas estarão infectadas com maiores cargas. Este padrão já foi encontrado em estudos anteriores (Grundler et al. 2012, Rodriguez et al. 2014, Ruano-Farjado et al. 2016, Ruggeri et al. 2018)

Análises dos resultados: para determinar a capacidade preditiva das variáveis ambientais em explicar a presença ou ausência de Rv e Bd nos diferentes tipos de habitat reprodutivos, será ajustado um Modelo Linear Generalizado (GLM). E será feito o teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA para determinar se a carga de infecção dos agentes patogênicos é diferente entre os três tipos de habitat reprodutivo.

CAPÍTULO III – Distribuição e Prevalência de infecção por Bd e Rv em espécies do gênero *Melanophryniscus* no Sul do Brasil

Hipótese: O Bd e o Rv estão distribuídos nas populações de anuros do gênero *Melanophryniscus*, e os indivíduos infectados por ambos agentes patogênicos, terão altas cargas de infecção. Na Mata Atlântica do Brasil, o Bd está distribuído em toda sua extensão (Jenkinson et al. 2016, Rodriguez et al. 2014, Carvalho et al. 2017), assim, o Bd deve estar presente nas populações de *Melanphryniscus*. Ainda, na região sul está localizado grande parte dos ranários no Brasil, (Both et al. 2011), fazendo com que estes animais atuem como vetor de Rv e Bd na região sul do Brasil, assim, as populações estudadas devem apresentar a infecção por Rv.

Análises dos resultados: será feito um gráfico com as localidades positivas para ambos os patógenos e um Modelo Linear Generalizado (GLM) será ajustado para determinar a capacidade preditiva das variáveis abióticas e bióticas em explicar a prevalência e carga de infecção pelo Bd e Rv nas diferentes populações. Para testar se a carga de infecção dos indivíduos infectados por Bd e Rv se difere da carga de infecção dos indivíduos com apenas um patógeno, será feito o U-teste de Mann-Whitney (em caso de anormalidade dos dados) e teste t (em caso de normalidade).

CAPÍTULO IV – Distribuição das linhagens de *Batrachochytrium dendrobatidis* e Ranavirus na Mata Atlântica Sul do Brasil

Hipótese: há mais de uma linhagem de Bd nas populações do gênero *Melanophryniscus* da região sul da Mata Atlântica. Em relação ao Rv, a estirpe presente nos anuros nativos é a FV3. A estirpe já diagnosticada em ranários brasileiros é a FV3, assim (Mazzoni, 2009), assim, é possível que as espécies foco deste estudo estejam infectadas com esta estirpe.

Análises dos resultados: As sequências de Rv obtidas serão alinhadas utilizando o programa (ClustalX -Thompson et al., 1997 ou Seq-Man™ II (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) e posteriormente comparadas com as sequências disponíveis no GenBank, usando a ferramenta BLAST. Em relação ao Bd, as sequências serão analisadas por meio do software Illumina MiSeq e alinhadas usando o software MUSCLE. Será feito um mapa com as distribuições das linhagens de Bd e Rv encontradas nas espécies de *Melanophryniscus* na região sul.

Plano de trabalho e cronograma de execução

Atividades	Semestres							
	2019	2020	2021	2022	2023			
Semestre	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	
Disciplinas		X						
Reuniões – comitê de acompanhamento	X		X		X		X	
Congressos			X		X			
Programa de Estágio Docente (PED)				X				
Coleta capítulo 1 (C1)	X		X		X			
Análises moleculares e estatísticas (C1)					X	X		
Redação do manuscrito						X		

Coleta capítulo 2 (C2)	X	X		
Análises moleculares e estatísticas (C2)		X	X	
Redação do manuscrito			X	
Coleta capítulo 3 (C3)			X	X
Análises moleculares e estatísticas (C3)			X	X
Redação do manuscrito				X
Genotipagem capítulo 4 (C4)				X
Redação do manuscrito (C4)			X	X
Qualificação			X	
Defesa da Tese				X

Referências

- Berger L., Hyatt, A.D., Speare, R., Longcore, J.E. 2005. Life cycle of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Dis. Aquat. Org. 68:51-63.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & Hyatt A D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis. Dis. Aquat. Organ., 60:141-148.
- Carey, C. & Michael A. S. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link?." Diversity and distributions. 9.2: 111-121.
- Cheng, T.L., Rovito, S.M., Wake, D.B., Vredenburg, V.T. 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108(23): 9502-9507.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. Science. 287:443-449.
- Daszak, P., Zambrana-Torrelli, C., Bogich, T.L., Fernandez, M., Epstein, J.H., Murray, K.A., Hamilton. H. 2013. Interdisciplinary approaches to understanding disease emergence: the past, present, and future drivers of Nipah virus emergence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110:3681-3688.
- Earl, J.E., Chaney, J.C., Sutton, W.B., Lillard, C.E., Kouba, A.J. et al. Gray, M.J. 2016. Ranavirus could facilitate local extinction of rare amphibian species. Oecologia, 182(2):611-623.
- Fox, S.F., Greer, A.L., Torres-Cervantes, R., Collins, J.P. 2006. First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. Dis. Aquat. Org. 72:87-92.
- Frost, D.R. 2019. Amphibian species of the world: an online reference. version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: jul. 2019.

- Fundação Zoobotânica. 2014. Avaliação do estado de conservação de espécies fauna - RS. Rio Grande do Sul, Brasil. Available from: <http://www.liv.fzb.rs.gov.br/livlof/?id_modulo=1&id_uf=23&ano=2012> Downloaded in: aug. 2019.
- Galli, L., Pereira, A., Márquez, A., Mazzoni, R. 2006. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture* 257:78–82.
- Haddad, C.F.B., Toledo, L.F., Prado, C.P.A., Loebmann, D., Gasparini, J.L. & Sazima, I. 2013. Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia. 1st Edition. Anolis Books Editora.
- IUCN 2019. The IUCN Red List of threatened species. Version 2019-1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>> Acesso em: ago. 2019.
- ICMBio/MMA. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério de Meio Ambiente. 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Volume 1.
- Kruger, K.M., Ashton, K.J., Hines, H.B. & Hero, J.M. 2007. On the biological relevance of a single *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore: a reply to Smith (2007). *Dis. Aquat. Organ.*, 73:257-260.
- Kolby, J.E., Smith, K.M., Berger, L., Karesh, W.B., Preston, A., Pessier, A.P. & Skerratt, L.F. 2014. First Evidence of Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Hong Kong Amphibian Trade. *Plos one*, 9(3): e90750.
- 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.
- Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J.R., Sears, M.W. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *Plos Biology*. 6(3): e72.
- 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.
- Mazzoni, R., Mesquita, A.J., Fleury, L.F.F., Brito, W.M.E.D., Nunes, I.A., Robert, J., Morales, H., Coelho, A.S.G., Barthasson, D.L., Galli, L., Catroxo, M.H.B. 2009. Mass mortality associated with a virus 3-like *Ranavirus* infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86: 181-191.
- Miller, D.L., Gray, M. & Storfer, A. 2011. Ecopathology of Ranavirus infecting amphibians. *Viruses*. 3:2351-2373.
- OIE (World Organisation for Animal Health). Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2018, Capítulo 2.1.2. Infection with ranavirus. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>>. Acesso em: ago. 2019.
- Price, S.J., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C; et al. & Bosch, J. 2014 Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Current Biology*. 24:2586-2591.
- Ruggeri, J., Ribeiro, L. P., Pontes, M. R., Toffolo, C., Candido, M. et al. & Toledo, L. F. (2019). First Case of Wild Amphibians Infected with Ranavirus in Brazil. *J. Wildlife dis*, 55.
- Reshetnikov, A.N., Chestnut, T., Brunner, J.L., Charles, K., Nebergall, E.E. & Olson, D.H. 2014. Detection of the emerging amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus in Russia. *Dis. Aquat. Org.* 110(3):235-240.

- Scheele, B.C., Pasmans, F., Skerratt, L.F., Berger, L., Martel, A. et al. & Canessa, S. 2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363:1459-1463.
- Schloegel, L.M., Daszak, P., Cunningham, A.A., Speare, R. & Hill, B. 2010a. Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. 92: 101-108.
- Schloegel, L.M., Ferreira, C.M., James, T.Y., Hipolito, M., Longcore, J.E., Hyatt, A.D., Yabsley, M., Martins, A.M.C.R.P.F., Mazzoni, R., Davies, A.J., Daszak, P. 2010b. The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, 13: 53-61.
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE et al. (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21, 5162–5177.
- Segalla, M.V., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Garcia, P.C.A., Grant, T., Haddad, C.F.B., Santana, D.J., Toledo, L.F., Langone, J.A. 2019. Brazilian Amphibians: List of species. *Herpetologia Brasileira* 8: 65–96
- Sutton, W.B., Gray, M.J., Hoveman, J.T., Secrist, R.G., Super, P.E. et al. & Miller, D.L. 2015. Trends in Ranavirus prevalence among Plethodontid salamanders in the Great Smoky Mountains National Park. *EcoHealth*. 12:320-329.
- Warne, R.W., LaBumbard, B., LaGrange, S., Vredenburg, V.T., Catenazzi, A. 2016. Co-infection by chytrid fungus and *Ranaviruses* in wild and harvested frogs in the tropical Andes. *Plos One*. 11(1):e0145864.
- Whitfield, S.M., Geerdes, E., Chacon, I., Rodriguez, E.B., Jimenez, R.R. et al. & Kerby, J.L. 2013. Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Dis. Aquat. Org.* 104(2):173-178.