



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PRISCILLA SANTANA SILVA

**FUNGOS ASSOCIADOS À COMUNIDADE DE ANFÍBIOS ANUROS NO
PARQUE ESTADUAL DE DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE**



Recife, 2018

PRISCILLA SANTANA SILVA

FUNGOS ASSOCIADOS À COMUNIDADE DE ANFÍBIOS ANUROS NO PARQUE ESTADUAL DE DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como um dos requisitos exigidos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ednilza Maranhão dos Santos

Co-orientador (a): Fabiana Oliveira Amorim

Recife, 2018

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586f Silva, Priscilla Santana
Fungos associados à comunidade de anfíbios anuros no Parque
Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE / Priscilla Santana Silva. –
Recife, 2018.
96 f.: il.

Orientador(a): Ednilza Maranhão dos Santos.
Coorientador(a): Fabiana Oliveira Amorim.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Bacharel em Ciências Biológicas,
Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e anexo(s).

1. Anfíbios 2. Fungos 3. Diagnóstico microbiológico 4.
Microbiologia I. Santos, Ednilza Maranhão dos, orient. II. Amorim,
Fabiana Oliveira, co-orient. III. Título

CDD 574

PRISCILLA SANTANA SILVA

FUNGOS ASSOCIADOS À COMUNIDADE DE ANFÍBIOS ANUROS NO PARQUE ESTADUAL DE DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE

BANCA EXAMINADORA:

PROF.^a DRA. EDNILZA MARANHÃO DOS SANTOS
(ORIENTADORA- 1º Titular)

Universidade Federal Rural De Pernambuco

PROF. DR. MARCOS ANTONIO BARBOSA DE LIMA
(2º Titular)

Universidade Federal Rural De Pernambuco

**PROF.^a DRA. LOURINALDA LUIZA DANTAS DA SILVA SELVA DE
OLIVEIRA**
(3º Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Universidade Federal Rural De Pernambuco

PROF.^a Ma. EDIVANIA DO NASCIMENTO PEREIRA ALCANTARA
(Suplente)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data de Aprovação: 21/02/2018

Nota: 10,0

*Dedico, ao meu Deus pela força e
sabedoria que me concedeu e aos meus
pais pelo apoio recebido, obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus por suas promessas em minha vida que me fez chegar até onde eu cheguei, sei que não foi fácil, mas ele me deu força, esperança e sabedoria para continuar na minha jornada, serei sempre grata a ti meu Pai.

Agradeço aos meus pais Carlos Manuel e Luciana Santana, que ao longo desse tempo sempre me incentivaram a continuar me encorajando a não desistir, sempre me fornecendo apoio moral e financeiro, dedico esse Trabalho de Conclusão de Curso aos meus pais com todo o meu amor, só tenho que agradecê-los.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pela a oportunidade de cursar esse curso lindo e apaixonante, que me proporcionou muitos conhecimentos que levarei para toda a minha vida, muito obrigado.

Agradeço a minha Orientadora Ednilza Maranhão dos Santos, pelo conhecimento repassado desde o meu primeiro período, só tenho que lhe agradecer por sua amizade que acrescentou muito em minha vida, obrigada por acreditar em mim, me dando o seu voto de confiança ao longo desses anos, que Deus lhe abençoe minha grande amiga, minha Profe do meu coração.

A minha Co-orientadora Fabiana Amorim, pois mesmo não lhe conhecendo pessoalmente, já tenho um carinho enorme por você, mesmo à distância. Obrigada pelas longas conversas online, me auxiliando no que eu precisava, espero abraçá-la um dia.

Agradeço ao Parque Estadual de Dois Irmãos, que abriu as portas para que eu pudesse desenvolver minhas pesquisas, agradeço o apoio concedido nesses cinco anos de estudos e pesquisas.

Agradeço aos laboratórios de pesquisas ao qual eu frequento pelos bons ensinos durante toda a graduação. Ao Laboratório

Interdisciplinar de Anfíbios e Répteis (L.I.A.R) coordenado pelas professoras Ednilza Maranhão e Jozelia Correia, obrigado pelo companheirismo e por toda bagagem adquirida; Ao Laboratório de Microbiologia da UFRPE, que permitiu o cultivo de minhas amostras biológicas que somaram para a conclusão deste trabalho e a Bióloga Rosa Galdino que me ensinou tudo que eu sei sobre microbiologia dentro de laboratório, além disso, pude ganhar a sua amizade que me rendeu boas risadas, muito obrigada Rosa por todo o seu tempo dedicado a minha pesquisa nas análises; Ao Laboratório de Micologia da UFPE, pelo apoio as identificações dos fungos, que foram possíveis através de Diogo Xavier, que dedicou um espaço de seu tempo para me ajudar nas análises, muito obrigado Diogo por toda ajuda concedida.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro concedido que possibilitou a realização de grandes partes de análises que estão neste Trabalho de Conclusão de Curso, muito obrigado.

Aos meus amigos que adquirir nesses anos na Universidade, amigos de classe, de laboratório que vivi boa parte de meu tempo em aulas, campo ou laboratórios, muito obrigado por todo o carinho e pelas amizades que construí; Andrezza Pimentel, minha amiga de aula e estagio BIA, no Zoológico, começamos tão cedo e hoje em dia ainda somos muito próximas, agradeço o seu carinho, a Emerson Gonçalves meu parceiro de campo e até mesmo de laboratório quando precisei por estar cirurgiada, muito obrigado por sua amizade e por nossas descobertas no universo científico.

Agradeço ao meu noivo Heitor Arão, que desde que o conheci, ele sempre foi presente nas minhas escolhas, nas minhas atividades aqui na universidade, quantas vezes eu tive que me ausentar devido a viagens de aula, ou até mesmo em campo e ele

sempre se mostrando compreensivo me ajudando bastante diretamente ou indiretamente; uma hora estava no laboratório junto comigo durante horas ou em casa me enviando mensagens de apoio diariamente, muito obrigado Heitor você é muito importante pra mim.

E a todos que de forma indireta também me ajudaram para a conclusão deste trabalho, só tenho a agradecer a Deus por pessoas incríveis que cruzaram a minha vida e me marcaram.

OBRIGADO (A) !!!

Em todo o tempo ama o amigo e na hora da angústia nasce o irmão.

Provérbios 17:17

Salmos 115

- 1. Não a nós, SENHOR, não a nós, mas ao teu nome dá glória, por amor da tua misericórdia e da tua fidelidade.*
- 2. Por que diriam as nações: Onde está o Deus deles?*
- 3. No céu está o nosso Deus e tudo faz como lhe agrada.*
- 18. Nós, porém, bendiremos o SENHOR, desde agora e para sempre. Aleluia!*

RESUMO

A Classe Amphibia sofre diversos fatores de ameaças de forma natural ou provocada, fazendo essas espécies declinar diante da perda de habitat e doenças emergentes por vírus, bactérias e helmintos. Há ainda outro fator que vem causando declínios em massa de espécies de anfíbios acarretados pela quitridiomicose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. O objetivo deste trabalho é obter um diagnóstico das metodologias utilizadas para identificação de fungos patógenos como o *Batrachochytrium dendrobatidis* assim como verificar a ocorrência de fungos associados à comunidade de anfíbios anuros no Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE. A metodologia consistiu de coleta de dados realizada através de análises bibliográficas abrangendo informações sobre métodos utilizados para detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), em bases de pesquisa como a Plataforma Capes, Scielo, Scopus, em artigos científicos publicados nos anos de 2007 a 2017; além de coletas bimestralmente durante dez dias consecutivos, nos turnos diurnos e noturnos, no período de outubro de 2015 a abril de 2017 no Parque Estadual Dois Irmãos, uma Unidade de Conservação de Mata Atlântica úmida, localizado na Região metropolitana do Recife (8°7'30"S e 34°52'30"W), com área de 1.157,74 ha, desses, 14 ha está situado o Zoológico de Recife. O material biológico foi coletado através de swabs estéreis aplicados na superfície do dorso, ventre, dedos e membranas interdigitais de anuros, sendo esse material biológico conservado em baixas temperaturas para a realização de futuras análises microbiológicas. Obtendo os seguintes resultados como a categorização de 8 técnicas de identificação da quitridiomicose através de uma revisão bibliográfica em 92 artigos científicos publicados em 29 revistas científicas, sendo possível obter 31 tipos de métodos para se trabalhar com os anfíbios para se obter o produto final que é a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e para as análises microbiológicas foram coletadas amostras biológicas de 32 indivíduos de anuros distribuídos em 10 espécies de anuros pertencentes a 4 famílias de anuros, dessas amostras foi possível identificar fungos pertencentes a família Trichocomaceae com as espécies de *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx), *Penicillium fellutanum*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus sp.* e *Paecilomyces sp*, além do gênero *Tremella sp.* Pertencente a família Tremellaceae. Esse

trabalho desempenha e fornece conhecimentos conservacionistas para diminuição de declínios de anuros assim como prover dados com potenciais farmacológicos.

Palavras chaves: *Batrachochytrium dendrobatidis*, quitridiomicose, declínio de anfíbios e microbiota.

SUMMARY

The Amphibia Class suffers various natural or induced threat factors, causing these species to decline in the face of habitat loss and emerging diseases by viruses, bacteria and helminths. There is also another factor that has been causing mass declines in amphibian species caused by chytridiomycosis caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. The objective of this work is to obtain a diagnosis of the methodologies used to identify pathogenic fungi such as *Batrachochytrium dendrobatidis* as well as to verify the occurrence of fungi associated with the anuran amphibian community in Dois Irmãos State Park, Recife, PE. The methodology consisted of data collection through bibliographical analyzes covering information on methods used to detect the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), in research bases such as the Capes, Scielo and Scopus platform in scientific articles published in the years 2007 to 2017 ; in addition to collecting bimonthly for ten consecutive days, in the day and night shifts, from October 2015 to April 2017 at Dois Irmãos State Park, a Wet Atlantic Forest Conservation Unit located in the metropolitan region of Recife ($8^{\circ} 7'30''S$ and $34^{\circ} 52'30''W$), with an area of 1,157.74 ha, of which 14 ha is located the Zoo of Recife. The biological material was collected through sterile swabs applied to the surface of the back, belly, fingers and interdigital membranes of anurans, and this biological material is conserved at low temperatures for future microbiological analyzes. Obtaining the following results as the categorization of 8 techniques of identification of chytridiomycosis through a bibliographic review in 92 scientific articles published in 29 scientific journals, it being possible to obtain 31 types of methods to work with amphibians to obtain the final product that is the presence of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and for the microbiological analyzes were collected biological samples of 32 individuals of anurans distributed in 10 species of anurans belonging to 4 families of anurans, of these samples it was possible to identify fungi belonging to the family Trichocomaceae with the species of *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx), *Penicillium fellutanum*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus* sp. and *Paecilomyces* sp., in addition to the genus *Tremella* sp. Belonging to the Tremellaceae family. This work performs and provides conservationist

knowledge to reduce anuran declines as well as to provide data with pharmacological potentials.

Key words: *Batrachochytrium dendrobatidis*, chytridiomycosis, amphibian decline and microbiota.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1.	Objetivo Geral	21
2.2.	Objetivos Específicos	21
3.	REFERENCIAL TÉORICO	21
3.1.	Aspectos da história de vida dos anuros	21
3.2.	Declínios de anuros	22
3.3.	Alguns patógenos de anfíbios	26
3.4.	Fungo patógeno de anfíbios- A quitridiomicose	27
4.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO I: FUNGO <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (LONGCORE, PESSIER E DK NICHOLS 1999): UM DIAGNÓSTICO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISES PARA IDENTIFICAÇÃO		38
1.	INTRODUÇÃO	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1.	Coleta dos Dados	40
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO II: FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A COMUNIDADES DE ANFÍBIOS ANUROS NO PARQUE ESTADUAL DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE		62
1.	INTRODUÇÃO	63
2.	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1.	Área de Estudo	64
2.2.	Captura e coleta	64
2.3.	Análise Microbiológica	67
2.4.	Composição de outros tipos de meio utilizados no semeio	70
2.4.1.	O Meio Batata- Dextrose- ágar (BDA)	70
2.4.2.	O Meio Malte	70
2.4.3.	O Meio Czapek (CZ)	71
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1.	Lista Descritiva da microbiota existente nas espécies de anfíbios do Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE.	75
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
6.	APÊNDICE	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: FUNGO BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS (LONGCORE, PESSIER E DK NICHOLS 1999): UM DIAGNÓSTICO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISES PARA IDENTIFICAÇÃO	38
Figura 1: Maior ocorrência de publicação de <i>Batrachochytrium dendrobatis</i> definidas por anos.	48
Figura 2: Abundância das ordens das espécies analisadas em artigos científicos.	48
Figura 3: Abundância das famílias das espécies da ordem Anura analisadas em artigos científicos.	49
Figura 4: Abundância das famílias das espécies da ordem Urodela analisadas em artigos científicos.	49
CAPÍTULO II - FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A COMUNIDADES DE ANFÍBIOS ANUROS NO PARQUE ESTADUAL DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE	62
Figura 1: A- Mapa do Estado de Pernambuco, evidenciando o estado em que ocorre a área de estudo; B- Mata Atlântica do Parque Estadual de Dois Irmãos – PEDI - Vista aérea da Mata de Dois irmãos, o zoológico, açude Dois Irmãos e açude do Meio. Fonte: SECTMA.	64
Figura 2: A- Buscas passivas realizadas através da armadilha de intercepção em queda conhecida como <i>pitfall</i> em forma de Y, B-Montagem dos <i>pitfalls</i> . Fonte: Vanessa Nascimento.	65
Figura 3: As pesquisas foram realizadas em parcelas tendo o módulo RAPELD montado.	66
Figura 4: A- Coleta de Material Biológico com o swabs em uma <i>Hypsiboas atlanticus</i> (Caramaschi e Velosa, 1996); B- <i>Eppendorf</i> com o material biológico armazenado, com identificações de cada indivíduo.	67
Figura 5: A e B- O material biológico sendo distribuído no ágar com um swab, procedimento realizado na Cabine de fluxo laminar e com chama de fogo para não contaminar o experimento; C- Placas de Petri empilhadas em uma prateleira para receber a iluminação para ocorrer o crescimento e D- Umas das amostras mostrando uma incrível variedade de bactérias e fungos, que cresceu	69

dentro da placa de Petri.

- Figura 6:** A- Observação de estruturas dos microrganismos no microscópico óptico; B- Método do micro cultivo que possibilita observar estruturas intactas dos microrganismos. **70**
- Figura 7:** Abundancia dos fungos encontrados nos anfíbios anuros do PEDI. **72**
- Figura 8:** Descrição do fungo *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx), coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google. **75**
- Figura 9:** Descrição do fungo *Penicillium citrinum*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google. **76**
- Figura 10:** Descrição do fungo *Penicillium fellutanum*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google. **76**
- Figura 11:** Descrição do gênero *Paecilomyces*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google. **77**
- Figura 12:** Descrição do gênero *Aspergillus*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google. **78**
- Figura 13:** Descrição do gênero *Tremella*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google. **78**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: FUNGO BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS (LONGCORE, PESSIER E DK NICHOLS 1999): UM DIAGNÓSTICO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISES PARA IDENTIFICAÇÃO	38
Tabela I: Espécies presentes na análise dos artigos científicos bibliográficos.	50
Tabela II: Metodologias Utilizadas em Artigos Científicos para a Identificação do Fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	56
CAPÍTULO II - FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A COMUNIDADES DE ANFÍBIOS ANUROS NO PARQUE ESTADUAL DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE	62
Tabela I: Dados de riqueza, diversidade das espécies de anuros coletadas e espécies de fungos encontrados no material biológico coletado dos anuros do PEDI, evidenciando o local e as parcelas do PPBio no Parque Estadual dois Irmãos, Recife- PE.	73

LISTA DE APÊNDICE

CAPÍTULO II - FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A COMUNIDADES DE ANFÍBIOS ANUROS NO PARQUE ESTADUAL DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE	62
Apêndice I: Lista Descritiva de espécies de anfíbios do Parque Estadual Dois Irmãos com imagens das colônias de fungos e imagens de estruturas encontradas de fungos.	82
Apêndice II: Módulo RAPELD	95

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ecossistemas mundiais vêm sofrendo com a perda da biodiversidade (MOYLE E WILLIAMS, 1990; DIEMER E SCHMID, 2001; PRIMACK ERODRIGUES, 2001), devido a destruição dos habitats naturais por influências antrópicas, diante dessa problemática os anfíbios anuros são considerados um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção no mundo (VERDADE *et al.*, 2010). E como medida preventiva para conservação da biodiversidade existe as unidades de conservação, com função de preservar o habitat natural, contribuindo de tal forma, que estará preservando um maior número de espécies possível, de acordo com critérios de seleção de áreas prioritárias para ser conservado (PRESSEY *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2005). Uma forma de identificação de áreas prioritárias para conservação é por meio dos *hotspots*, baseando-se em critérios como endemismo e grau de ameaça de habitats naturais degradados (MYERS *et al.*, 2000). A Mata Atlântica e o Cerrado brasileiro são um destes *hotspots* (MYERS *et al.*, 2000).

A Mata Atlântica apresenta um domínio morfoclimático que favorece um alto grau de endemismo (FEIO, R. N. *et al.*, 1998; LEWINSOH & PRADO, 2004; SBH; 2009), sendo um bioma megadiverso, todavia o mais ameaçado (MYERS, N. *et al.*, 2000). Uma das maiores riquezas do mundo é a fauna de anfíbios que a Mata Atlântica abriga com mais de 350 espécies, sendo a maioria descritas nos últimos 40 anos (SBH, 2012).

Declínios populacionais de anfíbios anuros já está observado em várias áreas sendo considerado um problema mundial, tendo registro desde a década de 80 em diferentes biomas, principalmente na Mata Atlântica. Os fatores que induziram a diminuição de populações de anfíbios anuros e até mesmo a extinção de muitas espécies são o desmatamento, mudanças climáticas, chuva ácida, poluição terrestre e águas continentais, aumento da radiação de raios ultravioleta B (UVB), doenças infecciosas (LANOO, 2005), diminuição da camada de ozônio e introdução de espécies exóticas (HEYER *et al.* 1988; WEYGOLDT 1989; ABELSON 1990; BLAUSTEIN 1994; BLAUSTEIN & WAKE 1995). E isso é notável através de anuros que são bioindicadores de qualidade ambiental (BEISWENGER 1988; WEYGOLDT 1989; VITT *et al.* 1990; BLAUSTEIN & WAKE 1995) passando a adquirir comportamentos diferentes ao habitual, como ocupar habitats diferentes

devido à perda ou fragmentação de habitat, importante principalmente para espécies dependentes de micro habitat e microclimas florestais específicos (BERTOLUCI *et al.*, 2007), sendo esses dados sugerido como objeto de estudo na elaboração de planos de manejo para ocorrer conservação de habitats terrestres e aquáticos (e.g. BEISWENGER 1988; GIBBONS 1988; KENNETH DODD & CHAREST 1988) *et al.*, 2001). Segundo o histórico de fragmentação e degradação das Florestas Ombrófila Mista, está sendo considerada a possibilidade de que algumas populações estejam sofrendo ou já sofreram processos de declínio, e até tenham desaparecido de seu habitat natural (BEEBEE & GRIFFITHS, 2005; HADDAD & PRADO, 2005). Para o entendimento dos padrões de diversidade e distribuição das populações de anuros tornam-se cruciais para obter decisões conservacionistas para amenizar fatores de declínio (SILVANO & SEGALLA, 2005; ETEROVICK *et al.*, 2005). Diante de tantos fatores que ameaçam os anfíbios, existe também a ameaça por microbiota presente na pele dos mesmos. Essa microbiota associada a mecanismos bioquímicos, que são decorrentes da secreção das glândulas que pertencem à pele, proporciona uma proteção contra os microrganismos. Sendo essa proteção natural afetada por diversos fatores de condições ambientais adversas, os anfíbios tornam-se totalmente vulnerável a infecções por patógenos (CLOSS, F. K.; PUTZKE, J., 2017)., decorrente a algum descontrole ambiental a microbiota que protegia passa a não proteger mais fazendo com que abram as portas para fungos patogênicos atuarem e ser o dos principais motivos do declínio em populações de anfíbios, que ocorre principalmente no bioma Mata Atlântica (CLOSS, F. K.; PUTZKE, J., 2017).

O patógeno atualmente mais registrado e associado ao declínio de anfíbios é o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* que foi descrito utilizando materiais orgânicos em ambiente estéril úmido, areia do rio, crescendo em penas estéreis, algas mortas e em exoesqueletos de artrópode (GARMYN, *et al.*, 2012), esse fungo apresenta afinidade pela queratina de outras fontes, em especial a queratina de algas, porém na ausência dessas algas o fungo supriu a necessidade pela queratina da epiderme de anfíbios tornando-se um dos motivos que vem contribuindo para que ocorra a infecção por *B. dendrobatidis* em anfíbios, que de acordo com o quadro de vulnerabilidade dos mesmos

começou a surgir relatos de morte em espécies sensíveis (MCMAHON, et al, 2013). Diante disso a forma de disseminação se alastrou e hoje é responsável pelas graves diminuições ou extinções populacionais em várias regiões do nosso planeta. Com isso a biologia desse patógeno está sendo ainda muito desconhecida, o que continua sendo uma área de pesquisa ativa para ecologistas e biólogos em buscas de metodologias para o controle de declínio aos anfíbios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter um diagnóstico das metodologias utilizadas para identificação de fungos patógenos como o *Batrachochytrium dendrobatidis* assim como verificar a ocorrência de fungos associados à comunidade de anfíbios anuros no Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife- PE.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Obter diagnóstico das metodologias utilizadas no registro do fungo *B. dendrobatidis*, com base em dados secundários;
- 2.2.2. Verificar a ocorrência de fungos filamentosos associados ao tegumento da pele de anfíbios analisando tipos de simbiose aos mesmos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. ASPECTOS DA HISTÓRIA DE VIDA DOS ANUROS

A Classe Amphibia é caracterizada por vertebrados tetrápodes que possui tegumento úmido e nenhuma escama. Os anfíbios são compostos por ordens distintas denominadas de Anura (sapos, rãs e pererecas); Urodea (tritões e salamandras) e Gymnophiona (cecílias) segundo POUGH et al, 2008. Os anfíbios possuem quatro patas desenvolvidas, mas ocorre que algumas salamandras não apresentarem patas e todas as cecílias não possuem patas, sendo também chamados de ápodes. Os anfíbios necessitam da superfície do tegumento úmido para realizar trocas gasosas e também liberar o dióxido de carbono para o meio externo.

Os anuros possuem duas fases de vida, a fase larval que ocorre no meio aquático cuja respiração se dá por meio de brânquias; e a fase adulta

que ocorre no meio terrestre respirando por meio de pulmões e por respiração cutânea em ambiente úmido o que permite que a superfície do corpo esteja sempre úmida facilitando a troca de gases. Além disso, existem espécies de anuros que não possui desenvolvimento larval, apresentando desenvolvimento direto, nascendo anuros em miniaturas iguais à fase adulta, tendo como exemplo o *Pristimantes ramagii* (Boulenger, 1888).

Os anuros são importantes por serem biocontroladores, controlando a fauna de insetos, mamíferos e aves em seu habitat, sem esse controle é desencadeado o fenômeno de praga ocasionando um desequilíbrio na teia alimentar; os anuros também são bioindicadores, que indica que a presença ou a ausência de alguma espécie de anuros em seu habitat ou não, vai está informando a situação ambiental do habitat, se está saudável ou não saudável; além disso, os anuros podem sim apresentar importância farmacêutica por possuir toxinas presentes na microbiota em seu tegumento, que pode ser benéfica para produção de medicamentos humanos.

3.2. DECLÍNIO DE ANUROS

Os anfíbios são vítimas de diversos fatores que levam a essa classe ao declínio, seja esses fatores ocorridos de forma natural ou até mesmo ocasional, o fato é que espécies de anuros, estão perdendo seu espaço em nosso planeta e também a sua importância ao meio ambiente. E uma dessas preocupações, considerada um dos maiores problemas, é justamente a perda de biodiversidade e isso nada mais é do que recorrente ao desmatamento que destrói todos os recursos que beneficia a sobrevivência de anuros em seu habitat. Sendo esse recurso, uma vegetação, uma poça temporária, tocas em tronco, etc., essas espécies deixam de existir se não houver no ambiente os elementos cruciais para fazer ela se desenvolver (MOYLE & WILLIAMS, 1990; DIEMER & SCHMID, 2001; PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Como medidas preventivas as Unidades de Conservação surgiram para amenizar perdas de biodiversidade, com intuito de preservação de espécies com grau de ameaças, garantindo a sua importância no habitat. Para isso foi criado o termo “hotspots” que está indicando que existem áreas naturais com alta taxa de endemismo e que necessita ter a diversidade ecológica ameaçada conservada (MYERS *et al.*, 2000). A lista de espécies ameaçadas contribuiu para a realização de planos de conservação em Unidades de Conservação para preservar as espécies que apresentam categorias de

ameaças no habitat, sendo essas listas disponíveis para fornecer informações específicas sobre o tipo de ameaça, o habitat predominante da espécie, o grau de ameaça, etc. (GAYER *et al.*, 1988, KWET & DI BERNARDO, 1999, DI BERNARDO *et al.*, 2004, LOEBMANN 2005, LOEBMANN & VIEIRA 2005, BORGES-MARTINS *et al.*, 2007, DEIQUES *et al.*, 2007).

A Mata Atlântica é bastante conhecida por ser um bioma que abriga uma das maiores diversidades de anfíbios no mundo, com espécies endêmicas e com grande grau de ameaçada no Brasil (SUBIRÁ *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2013), esse bioma sendo megadiverso, ainda apresenta lacunas acerca de diversidade de anfíbios (LUCAS, 2008), isso porque as espécies sofrem pressão devido a destruição dos habitats naturais e pelas influências de ações antrópicas.

Anfíbios anuros sofrem ameaças mundialmente e essa preocupação não é algo recente, pois ameaças e declínio foi discutido pela primeira vez na Inglaterra em 1989 no Primeiro Congresso Mundial de Herpetologia segundo WAKE, 1991. Nos Estados Unidos no ano de 1990, em um Congresso esse tema também foi debatido e chegaram à conclusão de formação de um grupo de trabalho internacional onde pesquisadores teriam que desenvolver pesquisas relacionadas à conservação de anfíbios. E com o patrocínio da União Internacional para a Conservação de Natureza (IUCN), foi criado o grupo Declining Amphibian Population Task Force (ou DAPTF) no ano de 1991, que trabalham fazendo sugestões políticas relacionadas a causas de declínios populacionais ou desaparecimentos para amenizar esse impacto. E no Brasil é abrigada a maior diversidade de anuros com cerca de 850 espécies (FROST, 2009; SBH, 2009). Perante isso, o Brasil comanda o ranking de mais espécies de anuros e também tem um diferencial, pois dessas espécies aqui abrigadas maior parte delas são endêmicas o que causa apreensão, pois se acontecer dessas espécies sofrerem declínios deixaria de existir, isso incluiria na perda de biodiversidade, a quebra das cadeias ecológicas e a eliminação de material genético de potencial uso no futuro, entre outras. Além do mais, o mundo perderia o conhecimento sobre sua ecologia e importância em seu habitat.

O Brasil ocupa o quarto lugar em número de espécies de anfíbios ameaçados, segundo os dados da IUCN, 2008, apresentando uma porcentagem expressivamente mais baixa de espécies ameaçadas quando se

compara a média do mundo. Mas o que levou ao Brasil a essa ocupação nesse ranking de ameaças aos anfíbios foi justamente a destruição de habitats naturais (FONSECA *et al.* 2008; LOPES 2006). E a maioria da perda de habitat refere-se à Mata Atlântica, um dos “hotspots” de biodiversidade (MYERS *et al.* 2000; TABARELLI *et al.*, 2005) que com cerca de 12% de cobertura original remanescente vêm sendo afetado por essa perda de habitat (RIBEIRO *et al.* 2009), e essa perda está tornando ambientes com vários fragmentos distribuídos em áreas urbanas, industrias, áreas agropecuárias (IBGE, 1992; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 1994; DEAN, 2002), resultando em áreas naturais cada vez menores e isoladas entre si (LOVEJOY *et al.*, 1986; BIERREGAARD *et al.*, 1992). Com o resultado dessa prática o habitat sofre com as alterações dos padrões de abundância e diversidade de táxons de anfíbios nas áreas diretamente afetadas (TILMAN *et al.*, 1994; TERBORGH *et al.*, 1997), pois é inevitável que ocorra o isolamento de populações que aumenta as chances de cruzamentos entre indivíduos de parentesco próximo e resultar na redução da diversidade genética (VIANA & PINHEIRO, 1998; VARGAS, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013). Quando isso acontece, aumenta a chance de ocorrerem problemas durante o desenvolvimento, bem como a chance de a população ser seriamente afetada por agentes infecciosos resultando em perda de ambientes reprodutivo, abrigo e alimentação (LIPS *et al.* 2005).

A introdução de espécies exóticas em nossa fauna contribui para ocorrência de declínio aos anfíbios, essas espécies são introduzidas na fauna de forma accidental ou até mesmo intencional, mas que acabam se naturalizando e começam a provocar mudanças em seu funcionamento (ZILLER, 2000; WINTER *et al.*, 2009; GILBERT & LEVINE, 2013; GOTELLI & COLWELL, 2001). Essas espécies exóticas se alimentam das espécies de anuros nativas e também competem por recursos importantes, em ambientes reprodutivos e por alimentos.

Além da predação e competição, as espécies introduzidas podem trazer doenças de outras localidades e transmitir para a fauna local, sendo prejudicial à fauna nativa por não apresentar imunidade para combater a doença exótica, devido a esse primeiro contato com o agente infeccioso

ocorre de muitas populações nativas podem ser dizimadas em um curto espaço de tempo (KATS & FERRER, 2003).

A radiação ultravioleta (UV) em níveis adequados é benéfica ao organismo. Em excesso, pode provocar mutações e deficiências imunológicas. Essa radiação é emitida pelo Sol e a intensidade com que atinge a Terra está destruindo a camada de ozônio da atmosfera que atua como um filtro natural de raios UV e tem sido destruída com a liberação de poluentes no ar que chegam à atmosfera, (BLAUSTEIN *et al.*, 2003). Em anuros, os raios UV atingem notadamente os ovos e embriões lesando o desenvolvimento dos mesmos ocasionando aberrações na morfologia e trazendo problemas no sistema imunológico, deixando-os mais vulneráveis ao ataque de agentes infecciosos.

A poluição por resíduos sólidos também conhecidos como lixo é muito frequente em áreas urbanas e vem apresentando um quadro altamente prejudicial aos anuros devido a exposição por compostos químicos, que podem ser liberados no ar, na água e até mesmo no solo. Os efeitos das substâncias liberadas podem ser em substâncias gasosas ou líquidas e podem apresentar um problema maior, muitas vezes desconhecidos e essa exposição dos agentes químicos podem ser levados a distâncias pelo vento ou então voltar em chuva ácida e também contaminar os lençóis freáticos, por esse motivo esses compostos podem sim causar declínios aos anfíbios por ser animais muito sensíveis à poluição ambiente (BULBOVAS *et al.*, 2008; SCHUYTEMA & NEBEKER, 1999; MARQUES *et al.*, 2011).

Outro fator que está envolvido no declínio dos anfíbios é o aquecimento global decorrente da liberação de gás carbônico por poluentes de áreas urbanas e indústrias, fazendo com que o efeito estufa aumente a temperatura terrestre, ocasionando eventos climáticos mais extremos como o verão cada vez mais quente e o inverno cada vez mais frio. Os efeitos dessas alterações climáticas sobre os anfíbios são drásticos (CAREY & ALEXANDER, 2003), pois o clima ideal é o que determina o começo, a duração e a intensidade da época reprodutiva desses animais, de tal forma que monitoramentos cuidadosos das populações em procriação podem prover um ensaio extremamente sensível de mudanças climáticas (HEYER, 1997).

3.3. ALGUNS PATÓGENOS DE ANFÍBIOS

A classe Amphibia está sujeita a contrair doenças emergentes, doenças de anfíbios através de agentes parasitários (DASZAK *et al.*, 2003), o que também pode levar ao declínio de populações de anuros. Como doenças emergentes se destacam algumas doenças que teve grandes repercussões relatando grandes declínios em massa. O Vírus *Ranavírus* (Iviridae) infecta e causa doenças em peixes e répteis, mas é conhecido por sua capacidade de causar infecções sistêmicas em anfíbios causando doença letal nos anuros (PRICE *et al.*, 2014; JANCOVICH *et al.*, 2003) apresentando ocorrência nas Américas, Europa, Ásia e Austrália. A bactéria *Aeromonas hydrophila* é considerada um patógeno oportunistas, para homens e animais, além de agentes emergentes de toxinfecções alimentares (HAVELAAR *et al.*, 1992). As suas cepas podem causar doença em pescados e em anfíbios, deixando feridas abertas pela superfície dos mesmos, existindo certa controvérsia sobre só patogenicidade em humanos (DELGADO *et al.*, 2001).

A classe Trematoda representada pelos vermes parasitas pertencentes ao filo Platyhelminthes (platelmintos) sem dúvida causa problemas aos anfíbios fazendo com que infestações gerem más formações dos membros dos anuros o que lhes deixa mais vulnerável as competições em seu habitat, podendo ser declinado por predação ou por efeito do parasita em seu organismo. Dentre esses Trematoda, os helmintos são os mais comuns em parasitar invertebrados como anfíbios assim como os nematoídes que são parasitas no trato digestivo, pulmões e vasos sanguíneos desses anfíbios (POUGH *et al.* 2001). Há também parasitismo aos anuros através dos anelídeos e também os artrópodes, tendo como exemplo os ectoparasitos carrapatos do gênero *Amblyomma* (KOCH, 1844), segundo SMITH *et al.* 2008.

Os anfíbios apresentam ricas biomoléculas que recobre o tegumento da pele com um muco que é antimicrobiano (ASSIS, 2011), essas moléculas aliando-se a uma microbiota natural irá proporcionar uma defesa contra os patógenos, mas a falta dessa interação tem papel reverso a fatores ambientais desordenados, que permite que os anfíbios não apresentem um bem estar em seu habitat e acabe abrindo portas para infecções por meio de fungos que ameaçam a população dos anfíbios, (CLOSS, F.K.; PUTZKE, J.,

2017). Os fungos patógenos vêm sendo um dos causadores do declínio nas populações de anfíbios, incluindo o bioma Mata Atlântica (VALENCIA-AGUILAR *et al.* 2015). A espécie *Saprolegnia ferox*, afeta os anuros de forma inicial atacando os ovos desses anfíbios, isso vai permitir que não haja mais desenvolvimento de anfíbios e venha ocorrer o declínio pelo não nascimento das espécies de anfíbios.

3.4. FUNGO PATÓGENO DE ANFÍBIOS- A QUITRIDOMICOSE

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* descoberto em 1997, descrito em 1999, pertence ao Filo Chytridiomycota, Classe Chytridiomycetes e Ordem Chytridiales, é um fungo com um alto grau de infecção ao agente etiológico acusado por uma doença potencialmente letal ao anfíbio que é a quitridomicose. *B. dendrobatidis* é responsável por diversas mortes, ocasionando declínios de população de anfíbios na Austrália, Nova Zelândia, EUA, Central América, América do Sul, Espanha e Alemanha (BERGER *et al.* 1998, LIPS,1999, PESSIER *et al.* 1999, MUTSCHMANN *et al.* 2000, BOSCH *et al.* 2001, BRADLEY *et al.* 2002, GREEN *et al.* 2002, RON *et al.* 2003, WELDON *et al.* 2004) e também foi registrado em várias espécies de anfíbios e em diferentes localidades no Brasil (SILVANO & SEGALLA, 2005). Os Chytridiomycota vivem em ambiente aquáticos, com os zoósporos flagelados, livres, parasitando algas, plantas, invertebrados (GARMYN, *et al.*, 2012). *B. dendrobatidis* é um agente que tem como ecologia dispersar os zoósporos através da água (MORGAN *et al.*, 2007). Esses zoósporos se locomovem através do flagelo para encontrar fonte de queratina em um novo hospedeiro, penetrando as células de queratina, que é mais comum que ocorra através da pele (LONGCORE *et al.*,1999), muitas vezes esse tipo de transmissão nem sempre ocorre na água, mas em haver o contato até por vias de reservatório de disseminação do fungo. O *Bd* é a única espécie desse grupo que infecta anfíbios e passa a se desenvolver dentro das células queratinizadas da pele de anfíbios vivos (larvas e adultos), isso ocorre porque esse fungo apresenta afinidade com a queratina presente nas células (MCMAHON, *et al.*, 2013).

A quitridomicose ela ocorre quando os zoósporos do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE *et al.*,1999) penetram em um novo hospedeiro e rapidamente formem um esporângio que irá produzir mais

zoósporos (BERGER *et al*, 2005). Com a formação de novos zoósporos pode ser possível que ocorra a infecção a outros anfíbios ou que ocorra a autoinfecção pelo novo zoósporo ao hospedeiro. Essa infecção vai atuar em células queratinizadas da pele de anfíbios na fase adulta e no aparato bucal na fase larval, essa doença torna-se letal aos anfíbios, pois acaba gerando morte por interferência no processo respiratório e hídrico dos mesmos (LONGCORE *et al.*, 1999). A quitridiomicose compromete toda a fisiologia interna e externa dos anfíbios, com vários sintomas que destrói todo o bem estar desse anfíbio em relação ao seu habitat, além de ocasionar alterações de comportamento após essa infecção (PADGETT-FLOHR, 2007). Esses sintomas evidenciam alterações morfológicas após a infecção, vermelhidão da pele ventral, convulsões com extensão dos membros pélvicos, acumulação de escamas de pele sobre o corpo, descamação superficial da epiderme dos pés e das outras áreas, ligeira rugosidade da superfície com pequenas marcas na pele e presença de pequenas ulcerações e hemorragias. E como alterações comportamentais, a letargia faz com que os anfíbios apresentem uma profunda e prolongada inconsciência, o deixando incapaz de ir à procura por abrigo, podendo ser alvo de predadores, por não conseguirem fugir, além disso, ocorre a perda de reflexo de endireitamento e passando a apresentar uma postura anormal (PADGETT-FLOHR, 2007).

Diante os grandes impactos decorrentes a atuação do fungo *Bd* nas populações de anfíbios, existe uma atenção maior quanto ao problema de declínio de anfíbios, que é realizado grandes investimentos para realizações de pesquisas em busca de soluções de tratamento a quitridiomicose. Em realizações de experimentos foi comprovado que populações de anfíbios que apresentavam maiores carga da bactéria *Janthinobacterium lividum*, sobreviviam à exposição do fungo *Bd*, pelo fato que havia uma maior produção de compostos fungicidas pela bactéria *J. lividum* (BLACK, 2008; BRUCKER *et al.*, 2008).

Em Pernambuco o fungo *Bd* foi encontrado por CARNAVAL e colaboradores em 2006, desde já vem se ampliando as pesquisas de identificação desse fungo nas diversas cidades de Pernambuco, sendo muito insipiente, precisando de uma maior avaliação para detecção desse patógeno aos anfíbios nativos.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON, P. H. (1990). Incertezas sobre o aquecimento global. Ciência 247: 1529.
- ALMEIDA, F. S., MAYHE-NUNES, A. J., QUEIROZ, J. M. (2013). A importância de formigas poneromorfas para dispersão de sementes em ambientes alterados. *Sociobiologia* 60(3): 229-235. <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v60i3.229-235>.
- ASSIS, A. B. (2011). Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de floresta atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- BRADLEY, G. A., ROSEN, P. C., SREDL, M. J., JONES, T. R., LONGCORE, J. E. (2002). Quitridiomicose em rãs nativas do Arizona. *J Wildl Dis* 38: 206–212.
- BEEBEE, T. J. C. & GRIFFITHS, R. A. (2005). A crise do declínio dos anfíbios: um divisor de águas para a biologia da conservação? *Conservação Biológica* 125: 271-285.
- BEISWENGER, R. E. (1988). Integrando espécies de anfíbios anuros em programas de avaliação ambiental, p.159-165. In: R.C. SZARO, K.E. SEVERSON & D.R. PAITON (Eds). Gestão de Anfíbios, Répteis e Pequenos Mamíferos na América do Norte: Anais do Simpósio. Arizona, USDA Forest Service, Relatório Técnico Geral RM-166, 458p.
- BERGER, L. S., DASZAK, P. R., GREEN, D. E., CUNNINGHAM, A. A., GOGGIN, C. L., SLOCOMBE, R. R., M.A. HYATT, M. A., MCDONALD, A. D., K., HINES, R., LIPS, H. B., MARANTELLI, K. R., & PARKES, H., (1998) A quitridiomicose causa mortalidade de anfíbios associada a declínios populacionais nas florestas tropicais da Austrália e da América Central. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 9031-9036.
- BERTOLUCI, J.; BRASSALOTI, R. A.; JUNIOR, J. W. R.; VILELA, V. M.F. N. & SAWAKUCHI, W. O. (2007). Composição de espécies e semelhanças entre assembléias de anuros de sítios florestais no sudeste do Brasil. *Scientia Agricola* 64 (4): 364-374.
- BIERREGAARD, R. O.; LOVEJOY, T. E.; KAPOS, V.; SANTOS, A. A. dos; HUTCHINGS, R. W. (1992). A dinâmica biológica da floresta tropical.
- BORGES-MARTINS, M., COLOMBO, P., ZANK, C., BECKER, F.G. & MELO, M.T.Q. (2007). Anfíbios. Na Biodiversidade. Regiões da Lagoa e Casamento dos Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. (F. G. Becker, R.A. Ramos e L.A. Moura, orgs.). Ministério do Meio Ambiente / Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Brasília, p.276-291.

BOSCH, J., MARTÍNEZ-SOLANO, I., GARCÍA-PARÍS, M. (2001). Evidência de infecção por fungo quitrídio envolvida no declínio do sapo-parteiro comum (*Alytes obstetricans*) em áreas protegidas da Espanha central. Biol Conserv 97: 331-337.

BULBOVAS, P. et al. (2008). (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, - Malvaceae) ao ozônio. Hoehnea 35: 359-366.

PRETO, R. (2008). "Bactéria poderia parar o assassino de rã" Acessado em 7 de junho.

BLAUSTETN, A. R. (1994). Anfíbios em uma luz ruim. História Natural 9: 32-39.

BLAUSTETN, A. R. & WAKE, D. B. (1995). Declive de las poblaciones de anfíbios. Investigación y Ciencia 1995: 8-13.

BLAUSTEIN, A.R., ROMANSIC, J.M., KIESECKER, J.M. & HATCH, A. C. (2003). Radiação ultravioleta, produtos químicos tóxicos e declínio da população de anfíbios. Diversidade e Distribuição 9: 123-1 40.

BRUCKER, R.M., HARRIS, R.N., SCHWANTES, C.R., GALLAHER, T.N., FLAHERTY, D.C., LAM, B.A., MINBIOLE, K.P. (2008). Defesa química de anfíbios: metabólitos antifúngicos do microssimbionte *Janthinobacterium lividum* na salamandra *Plethodon cinereus*. J. Chem. Ecol. 34 (11): 1422-9. PMID 18949519. doi: 10.1007 / s10886-008-9555-7.

CAREY, C. & ALEXANDER, M. A. (2003). Mudanças climáticas e declínios de anfíbios, existe um link? Diversidade e Distribuição 9: 1 1 1-1 21.

CLOSS, F. K .; PUTZKE, J., (2017). Fungos aquáticos (Oomycota, Chytridiomycota) ocorreram em anfíbios anuros em dois remanescentes de Mata Atlântica, parentes em Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires, RS, Brasil. Caderno de Pesquisa. Santa Cruz do Sul, v. 29, n. 1, p. 01-08.

DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A & HYATT, A. D. (2003). Doença Infecciosa e Diminuição da População Anfíbia. Diversidade e distribuições, 9, 141-150.

DEAN, W. A. (2002) Ferro e Fogo: Uma História e uma Devastação da Mata Atlântica Brasileira. São Paulo: Cia das Letras.

DEIQUES, C.H., STAHNKE, L.F., REINKE, M. & SCHMITT, P. (2007). Guia ilustrado dos anfíbios e répteis do Parque Nacional de Aparelhos da Serra, no Rio Grande do Sul, em Santa Catarina. USEB, Pelotas.

DELGADO, M.L., O'CONNOR, J.E., AZORÍN, I., RENAU-PIQUERAS, J., GIL, M.L. & GOZALBO, D. (2001). Os polipéptidos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase codificados pelos genes TDH1, TDH2 e TDH3 da *Saccharomyces cerevisiae* são também proteínas da parede celular. *Microbiologia* 147: 411-417.

DIEMER, M; SCHMID, B. (2001). Efeitos da perda e da perturbação da biodiversidade na sobrevivência e no desempenho de duas espécies de *Ranunculus* com diferentes arquiteturas clonais. *Ecography*, Lund, v. 24, p. 59-67.

DI BERNARDO, M., OLIVEIRA, R. B., PONTES, G.M. F., MELCHIORS, J., SOLÉ, M. & KWET, A. (2004). Anfíbios anuros da região de extração e processamento de carvão de Candiota, RS, Brasil. Em *Estudos Ambientais em Candiota: Carga e seus impactos* (E.C. Teixeira e M.J. R. Pires, orgs.). 1 ed. Fepam, Porto Alegre, v.1, p.163-175.

ETEROVICK, P. C; CARNAVAL, A. C. O. Q.; BORJES-NOJOSA, D. M.; SILVANO, D.L; SEGALLA, M. V. & SAZIMA, I. (2005). Queda de anfíbios no Brasil: uma visão geral. *Biotropica* 37 (2): 166-179.

FEIO, R. N; BRAGA, U. M. L.; WIEDERHECKER, H.; SANTOS, P. S., (1998). Anfíbios do Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais). Universidade Federal de Viçosa, Instituto Estadual de Florestas, Viçosa, Brasil, 32 págs.

FONSECA, C.R., BECKER, C.G., HADDAD, C.B. & PRADO, P.I. (2008). Metamorfose: o world wide anfíbios is agravado pela desconexão entre o hábitat aquático dos girinos e o hábitat terrestre dos adultos, induzidas pelas atividades humanas. *Sci. Sou.* 72: 88-93.

FROST, D. (2009). Espécies anfíbias do mundo: uma referência online. Versão 5. 3. Nova York: Museu Americano de História Natural. Disponível em: <<http://www.research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>.

GARMIN, A., VAN, R.P., PASMANS, F., HELLEBUYCK, T., VAN DEN, B.W., et al. (2012). Aves aquáticas: potenciais reservatórios ambientais do fungo Chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. PLoS ONE 7 (4): e35038.

GAYER, S. M. P. GOMES, S & KRAUSE, L. S. (1988). Lista preliminar dos anfíbios da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Bras. Zool 5 (3): 419-425.

GIBBONS, W. (1988). O manejo de anfíbios, répteis e pequenos mamíferos na América do Norte: a necessidade de uma atitude ambiental, p.4-10. In: R.C. SZARO, K.E. SEVERSON & D.R. PATTON (Eds). Gestão de Anfíbios, Répteis e Pequenos Mamíferos na América do Norte: Anais do Simpósio. Arizona, USDA Forest Service, Relatório Técnico Geral RM-166, 458p.

GILBERT, B .; LEVINE, J. M. (2013). Invasões de plantas e dívidas de extinção. Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América, Washington, v. 110, n. 5, p. 1744-1749.

GOTELLI, N. J .; COLWELL, R. K. (2001). Quantificação da biodiversidade: procedimentos e armadilhas na medição e comparação da riqueza de espécies. Ecology Letters, 4: 379-391.

VERDE, D., CONVERSE, K. A., SHRADER, A. K. (2002). Epizootiologia de sessenta e quatro eventos de morbidade e mortalidade de anfíbios nos EUA, 1996-2001. Ann NY Acad Sci 969: 323-339.

HADDAD, C. F. B .; TOLEDO, L. F .; PRADO, C. P. A .; LOEBMANN, D .; GASPARINI, J. L; SAZIMA, I. (2013). Guia de anfíbios da Mata Atlântica: diversidade de biologia. São Paulo: Anolisbooks. 544 p.

HADDAD, C. F. B & PRADO, C. P. A. (2005). Modos reprodutivos em sapos e sua diversidade inesperada na Mata Atlântica do Brasil. BioScience 55 (3).

HVELAAR, A.H., SCHETS, F.M., VAN SILFHOUT, A. et al. (1992). Digitização de cepas de Aeromonas de pacientes com diarréia e de beber água. J. Appl. Bacteriol., V.72, p.435-444, 1992.

HEYER, W. R .; A. S. RAND; C. A. G. CRUZ e O. PEIXOTO (1988). Declinações, extinções e colonizações de populações de rãs no Sudeste do Brasil e suas implicações evolutivas. Biotropica 20: 230-235.

HEYER, W. R. (1997). Força-Tarefa da População Anfíbia em Declínio. Espécie 29: 66.

UNIÃO INTERNACIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DA NATUREZA. (2008). Conservation International & Nature Serve. Avaliação Global de Anfíbios. <http://www.globalamphibians.org> (último acesso em 03/03/2009).

JANCOVICH, J. S. K.; MAO, J.; CHINCHAR, V. G.; WYATT, C.; CASO, S. T.; KUMAR, S.; VALENTE, G.; SUBRAMANIAN, S.; DAVIDSON, E. W.; COLLINS, J.; JACOBS, B. L. (2003). "Seqüência genômica de um vírus" (família Iridoviridae) associada à mortalidade da salamandra na América do Norte ". *Virologia*. 316 (1): 90-103. doi: 10.1016 / j.virol.2003.08.001.

KATS, L. B. e R. P. FERRER. (2003). Predadores alienígenas e declínios de anfíbios: revisão de duas décadas de ciência e transição para a conservação. *Diversidade e Distribuição* 9: 99-1 10.

KENNETH-DODD, J. R., C. e CHAREST, B. G. (1988). A comunidade herpetofaunal de lagoas temporárias em restingas do norte da Flórida: composição de espécies, uso temporal e implicações de manejo, p.87-97. In: R.c. SZARO; K.E. SEVERSON & D.R. PATTON (Eds). Gestão de Anfíbios, Répteis e Pequenos Mamíferos na América do Norte: Anais do Simpósio. Arizona, USDA Forest Service, Relatório Técnico Geral RM-166, 458p.

KWET, A. & DI-BERNARDO, M. (1999). Anfíbios Pró-Mata. EDIPUCRS, Porto Alegre.

LANOO, M. (2005). Declínios de anfíbios: o status de conservação das espécies dos Estados Unidos. Berkeley, Universidade da Califórnia. p.03-06.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P.I., (2004), Biodiversidade brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento. Editor Contexto, 176 págs.

LÁBIOS. K. R. (1999). Mortalidade em massa e declínio populacional de anuros em um local de terras altas no oeste do Panamá. *Conserv Bio* 13: 117-125.

LIPS, K.R., BURROWES, P.A., MENDELSON, J.R. & PARRA-OLEA, G. (2005). Diminuição da população de anfíbios na América Latina: uma síntese. *Biotropica* 37 (2): 222-226.

LONGCORE, J.E., A. P. PESSION, & D. K. NICHOLS. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., um quitrídio patogênico para anfíbios. *Mycologia* 91: 219-227.

BERGER, L., HYATT, A. D., SPEARE, R. & LONGCORE, J. E. (2005). Dis. Aquat. Org. 68, 51-63.

LOEBMANN, D. (2005). Guia Ilustrado: Anfíbios da região costeira do extremo sul do Brasil. USEB, Pelotas.

- LOEBMANN, D. & VIEIRA, J. P. (2005). Relação dos Anfíbios do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, RS, Brasil. Rev. Bras. Zool 22 (2): 339-341.
- LOPES, J. S. L. (2006). Sobre os processos de ambientalização dos conflitos e sobre os dilemas da participação. Horizontes antropológicos. 12 (25): 31-64.
- LOVEJOY, T. E.; BIERREGAARD, R. O.; RYLANDS, A. B.; MALCOLM, J. R .; QUINTELA, C. E. HARPER, L. H .; BROWN, K. S .; POWELL, A. H .; POWELL, G. V. N; SCHUBART, H. O. R .; HAYS, M. B. (1986). Borda e outros efeitos do isolamento nos fragmentos florestais da Amazônia. Em: Soulé, M. E. (Ed.). Biologia da Conservação: A Ciência da Escassez e Diversidade. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, EUA. p. 257-285.
- LUCAS, E. G. (2008). Diversidade e conservação de anfíbios anuros no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. 2008. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- IBGE (1992). Manual Técnico da Vegetação Brasileira; Rio de Janeiro.
- MARQUES, S. M, ANTUNAS, S. C, NUNES, B., GONÇALVES, F. & PEREIRA, R. (2011). Resposta antioxidante e acúmulo de metal em tecidos de rãs verdes ibéricas (*Pelophylaxperezi*) que habitam uma mina de urânio desativada. Ecotoxicol 20: 1315-1327.
- MCMAHON, T.A., BRANNELLYB, L.A., CHATFIELDB, M.W., JOHNSONC, P.J., JOSEPHC, M.B., MCKENZIEC, V.J., RICHARDS-ZAWACKIB, C.L., VENESKYA, M.D., & ROHRA, J.R. (2013). O fungo Chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* possui hospedeiros não anfíbios e libera substâncias químicas que causam patologia na ausência de infecção. PNAS 7 (4): e35038.
- MOYLE, P. B .; WILLIAMS, J. E. (1990). Perda de biodiversidade na zona temperada - Declínio da fauna nativa de peixes da Califórnia. Conserv. Biol., Gainesville, v. 4, p. 275-284.
- MORGAN, J. A. T., V. T. VREDENBURG, L. J. RACHOWICZ, R. A. KNAPP, M. J. STICE, T. TUNSTALL, R. E. BINGHAM, J. M. PARKER, J. E. LONGCORE, C. MORITZ, C.J. BRIGGS, & J. W. TAYLOR. (2007). Genética de populações do fungo assassino de rãs *Batrachochytrium dendrobatidis*. Proceedings da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América 104: 13845-13850.
- MUTSCHMANN, F., BERGER, L, ZWART, P., GAEDICKE, C. (2000). Quitridiomicose em anfíbios - primeiro relato da Europa. Berl Münch Tierärzt Wochenschr 113: 380–383.
- MYERS, N; MITTERMEIER, R. A .; MITTERMEIER, C. G .; FONSECA, G. A. B .; KENT, J., (2000). hotspots de biodiversidade para as prioridades de conservação. Natureza, n. 403, pág. 853-858.

- OLIVEIRA-FILHO, A. T., VILELA, E. A., GAVILANESS, M. L., CARVALHO, D. A. (1994). Comparação da flora e solos lenhosos de seis áreas de floresta estacional semidecidual no sul de Minas Gerais. Edinburgh Journal of Botany; 51 (3): 355-389. <http://dx.doi.org/10.1017/S0960428600001839>.
- PADGETT-FLOHR, G.E. (2007). «Anfíbios Quitridiomicose: uma brochura informativa» (PDF). Centro da Califórnia para o Controle de Anfíbios. Consultado em 14 de outubro de 2013.
- PESSIER, A. P., NICHOLS, D.K., LONGCORE, J.E., FULLER, M. S. (1999). Quitridiomicose cutânea em sapos venenosos (*Dendrobates* spp.) E pererecas brancas (*Litoria caerulea*). J Vet Diagn Invest 11: 194-199.
- POUGH, F. H., R. M. ANDREWS, J. E. CADLE, M. L. CRUMP, A. H. SAVITZKY e K. D. WELLS. (2001). Herpetologia. 2 nd. Edição. Prentice hall, Nova Jersey. 612pp.
- POUGH, F.H., JANIS, C.M., HEISER, J.B. (2008). A vida dos vertebrados. Coordenação editorial da edição brasileira Ana Maria de Souza; tradutores Ana Maria de Souza, Paulo Auricchio. 4. Ed. São Paulo: Atheneu Editora.
- PRESSEY, R. L. et al. (1993). Além do oportunismo - Princípios-chave para a seleção sistemática de reservas. Tendências Ecol. Evol., Londres, v. 8, p. 124-128.
- PRIMACK, R.B .; RODRIGUES, E. (2001). Biologia da Conservação. 3. ed. Londrina: Midiograf.
- PRICE, S.J., GARNER, T.W. J., NICHOLS, R.A., BALLOUX, F., AYRES, C., ALBA, A.M. C., & BOSCH, J. (2014). Colapso das comunidades de anfíbios devido a um ranavírus introduzido. Current Biology 24, 2586-2591.
- RIBEIRO, M. C. et al. (2009). A Mata Atlântica brasileira: quanto resta e como a floresta remanescente é distribuída? Implicações para conservação. Conservação Biológica, v.142, p.1141-53.
- RON, S.R., DUELLMAN, W.E., COLOMA, L.A. & BUSTAMANTE, M. R. (2003). Declínio populacional do sapo Jambato *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) nos Andes do Equador. Journal of Herpetology 37: 116-126.
- SCHUYTEMA, G. S. & NEBEKER, A. V. (1999). Efeitos do nitrato de amônio, nitrato de sódio e ureia em rãs de patas vermelhas, pererecas-do-pacífico e sapos de garras africanas Bull Environ Contam Toxicol 63: 357-364.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA - SBH. (2009). Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>>. Acesso em: 8 set.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA - SBH. (2012). Lista de anfíbios do Brasil. <http://www.sbherpetologia.org.br/lista/anfibios.htm> (Último Acesso em 09/07/2013).

SILVA, J.C. et al., (2005). O destino das áreas de endemismo da Amazônia. Megadiversidade, Manaus, v. 1, p. 124-131.

SILVANO, D. C. & SEGALLA, M. V. (2005). Conservação de anfíbios brasileiros. *Conservation Biology* 19: 653-658.

SMITH R. L., J. A. SCHNACK, E. F. SCHAEFER e A. I. KEHR. (2008). Carrapatos, *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae), em Sapos, *Chaunus schneideri* e *Chaunus granulosus* (Anura: Bufonidae), no norte da Argentina. *Journal of Parasitology*, 94: 560-562.

SUBIRÁ, R. J .; SOUZA, E. C. F .; GUIDORIZZI, C. E .; ALMEIDA, M. P .; ALMEIDA, J. B .; MARTINS, D. S. (2012). Resistor de risco de extinção da fauna brasileira - Resultados alcançados em 2012. Biodiversidade Brasileira, Brasília, v. 2, n. 2, p. 17-24.

TABARELLI, M, PINTO, L.P., SILVA, J.C., HIROTA, M.M., BEDE, L.C. (2005). Desafios e oportunidades para um levantamento de biodiversidade na Mata atlântica brasileira. *Megadiversidade*; 1 (1): 132-138.

TERBORGH, J .; LOPES, L; TELLO, J; YU, D .; BRUNI, A. R. (1997). Estados transitórios em ecossistemas relaxantes de ilhas de pontes terrestres. Em: W. F. Laurance, R. O. Bierregaard (eds.). *Remanescente de Floresta Tropical: Ecologia, Manejo e Conservação de Paisagem Fragmentada*. Universidade de Chicago Press, Chicago, p. 256-274.

TILMAN, D .; MAIO, R. M .; LEHMAN, C. L .; NOWAK, M. A. (1994). Destrução do habitat e extinção da dívida. *Nature*, 371: 65-66.

VALENCIA-AGUILAR, A. et al. (2015). O fungo Chytrid atua como um patógeno generalista que infecta famílias de anfíbios ricos em espécies nas florestas tropicais brasileiras. *Doenças dos Organismos Aquáticos*. doi: 10.3354 / dao02845.

VARGAS, A. B. (2011). Diversidade de formulações em fragmentos florestais no Vale do Paraíba, Vassouras, Rio de Janeiro [tese]. Seropédica: Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

VERDADE, V. K; DIXO, M & CURCIO, F. F. (2010). *Estudos avançados* 24 (68).

VIANA, V. M., Pinheiro LAFV. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. *Série Técnica IPEF* 1998; 12 (32): 25-42.

- VITT, L.J .; 1.P. CALDWELL; H.M. WILBUR & D.e. SMITH (1990). Anfíbios como precursores da decadência. *Bioscience* 40: 418.
- WAKE, D. (1991). Diminuição das populações de anfíbios. *Science* 253: 26.
- WELDON, C., du PREEZ, L. H., HYATT, A. D., MULLER, R., SPEARE, R. (2004). Origem do fungo chytrid anfíbio. *Emerging Infect Dis* 10: 2100-2105.
- WEYGOLDT, P. (1989). Mudanças na composição de comunidades de sapos de riachos nas montanhas atlânticas do Brasil: rãs como indicadores de deterioração ambiental? *Viga. Neotropical Fauna Environ.* 243: 249-255.
- WINTER, M .; SCHWEIGER, O .; KLOTZ, S .; NENTWIG, W .; ANDRIOPoulos P .; ARIANOUTSOU, M .; BASNOU, C; DELIPETROU, P .; DIDŽIULIS, V .; HEJDA, M .; HULME, P. E .; LAMBDON, P. W; PERGL, J; PYŠEK, P .; ROYL, D. B .; KÜHN, I. (2009). Extinções e introduções de plantas levam à homogeneização filogenética e taxonômica do lora europeu. *Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América, Washington*, v. 106, n. 51, p. 21721-21725.
- ZILLER, S. R. (2000). A Estepe Gramíneo-Lenhosa no segundo planalto do Paraná: Diagnóstico ambiental com enfoque à contaminação biológica. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 268pp.

Capítulo I

Fungo Batrachochytrium dendrobatidis (Longcore, Pessier & Dk Nichols 1999): Um diagnóstico sobre métodos de análises para identificação

1. INTRODUÇÃO

Devido a vários fatores ambientais, como perda de habitat que leva a perda de biodiversidade (MOYLE E WILLIAMS, 1990), e doenças emergentes como vírus, bactérias, helmintos entre outros, os anuros são os mais ameaçados (LANOO, 2005), mas o que mais está levando esses anfíbios ao declínio em massa e de fácil disseminação é o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* um tipo de patógeno que penetra as células queratinizadas da epiderme desses anuros (BERGER et al, 1999), comprometendo a saúde desses organismos.

Pesquisadores vêm registrando declínio de espécies de anuros desde 1980, Toledo et al., 2006 relatou que no Brasil há registro de cerca de 21 espécies brasileiras acometidas pelo fungo e estão distribuídas em 15 localidades de Mata Atlântica , sendo esses registro de fungo *Bd* iniciado desde o ano de 1981 e vem até hoje acometendo várias espécies, no entanto ainda há muitas especulações sobre o desaparecimento de espécie por conta do fungo.

Para o registro do fungo há necessidade de utilização de diferentes técnicas, que para chegar ao diagnóstico preciso são difíceis de executar. Dentre essas, a identificação visual pode permitir que seja feito uma análise do tecido histológico para detecção de zoosporângios do aparelho bucal de girinos ou a despigmentação do aparato bucal; uma das problemáticas dessa análise é que pode gerar resultados falso positivos, comprometendo dados reais da análise; outra técnica seria a análise microbiológica através do material biológico presente no tegumento do anfíbio cultivado em laboratórios, ainda assim para se obter um resultado mais preciso existe o exame da Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e o qPCR para comprovar a infecção por *Bd* (LAMBERTINI et al, 2013). Essas últimas técnicas requer um melhor cuidado com os resultados, pois ambas são letais aos anuros, e a falha dessas análises seria em vão o sacrifício para o mundo científico para se obter medidas conservacionistas as espécies em categorias de ameaças. As diferentes técnicas utilizadas para o registro do fungo são bem diferenciadas, sugerindo a necessidade de um protocolo para melhor maneira de diagnóstico.

Atualmente existem no Brasil 1080 espécies de anfíbios, e a maioria pertence à ordem Anura (SBH, 2016), com cerca de 60% de endemismo. Há registro de 973 sendo avaliadas pelo ICMBio e pela IUCN, que listou cerca de 41 espécies ameaçadas, dessas, 28 espécies ocorrem no Nordeste. Esse grau de ameaça que leva ao declínio está relacionado com a perda de habitat e consequentemente mudanças do clima que também estão atreladas a outras ameaças, como acometimento por patógeno (MOYLE e WILLIAMS, 1990; DIEMER e SCHMID, 2001; PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

O fungo chítridio possui morfologia esférica com uma papila de descarga liberando zoósporos que saem da superfície da pele, essa estrutura é chamada de zoosporângio (LONGCORE et al., 1999), ele invade o estrato córneo e o estrato granuloso da camada subsuperficial da pele que é o órgão que se realiza o diagnóstico. A pele possui uma camada superficial queratinizada que quando é infectada tem a queratina destruída e ocupada por esporângios acarretando doenças aos anfíbios também conhecido com infecção quitridiomicose (BERGER et al, 1999).

A Quitridiomicose é uma doença causada pelo fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), que pode causar distúrbios fisiológicos e até mesmo comportamentais, atacando os anuros causando morte por interferência no processo respiratório e hídrico, acometendo indivíduos adultos na epiderme e também girinos nas peças bucais. E essa infecção tem sido associada ao declínio de centenas de espécies de anfíbios florestais tropicais intocadas (IUCN et al., 2015).

O presente trabalho teve como objetivo analisar as metodologias utilizadas em artigos científicos para um diagnóstico do fungo patógenico *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), no Brasil. Pretende também evidenciar as principais revistas científicas, número de espécies de anfíbios acometidas pelo fungo *Bd*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de dados

Foram realizadas análises bibliográficas abrangendo informações sobre metodologias utilizadas para detecção do fungo *Batrachochytrium*

dendrobatidis (*Bd*), em bases de pesquisa como a Plataforma Capes, Scielo, Scopus, buscas essas que ocorreram nos anos de 2007 a 2017, trabalhando com as palavras chaves: fungo patógeno anuros, *Batrachochytrium dendrobatidis*, quitridiomicose, declínio anfíbios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias foram categorizadas através de uma revisão bibliográfica em 92 artigos científicos publicados em 29 revistas científicas nos anos de 2007 a 2017. O intuito desse levantamento bibliográfico foi se familiarizar quanto ao tipo de metodologia mais utilizada. Até o momento foi possível categorizar 31 tipos de métodos para se trabalhar com os anfíbios para se obter o produto final que é a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Entre os artigos analisados foi possível conhecer 96 espécies trabalhadas com as metodologias dos artigos. A classe Amphibia evidenciou maior abundância da ordem anura com 75 espécies, cerca de 84,0% de presença dos anuros, esses anuros foram distribuídos em 12 famílias sendo a família Hylidae a mais representativa com um percentual de 37,3% representado por 28 espécies, é uma ordem mais afetada tendo em vista que esses animais vivem em diferentes ambientes possibilitando um aumento de espécies afetadas, seguido da família Ranidae com um percentual de 25,3% representados por 19 espécies (**Figura 3**); a ordem Urodela com 14 espécies apresentou um percentual de 16,0% de espécies que estão distribuídas em 4 famílias sendo a família Ambystomatidae a mais representativa com um percentual de 42,8% destinados de 6 espécies, seguido da família Plethodontidae com o percentual 28,5% com 4 espécies (**Figura 5**), além disso, foi possível identificar *Bd* em ambiente que esses anfíbios habitam, tendo como análise a água empossada da chuva (KOLBY, et al, 2015), folhas de plantas após o anuro posar, folhas essas que ficam em margens de rios e até mesmo a própria água do rio também pode ser analisada (KOLBY, et al, 2015). Também foi analisado outras espécies aquáticas que viessem a desempenhar o papel de reservatório para a disseminação desse fungo que se tornou patógeno aos anfíbios, espécies como lagostas, *Procambarus allenii* e *P. clarkii* (MCMAHON, et al, 2013), crustáceo, *Daphnia magna* (BUCK, 2011)

e aves como o pato, *Cairina moschata*, ganso, *Anser anser domesticus* e cisne, *Cygnus cygnus* (GARMYN, et al, 2012).

Dentre as categorias de metodologias encontradas na revisão desse estudo, 34,7% dos artigos eram compostos por revisão bibliográfica, com o intuito de se obter uma coleta de dados baseado em artigos que fornecem informações sobre o fungo *Bd* (**Tabela 2**), (**Figura 1**). Esses dados foram coletados em 29 periódicos diferentes, publicados ao longo de uma década com informações importantes sobre o *Bd* e sua patogenicidade, tais como alterações morfológicas e comportamentais após a infecção à classe dos anfíbios. Na análise bibliográfica teve maior relevância o ano de 2014 com cerca de 23,9% de pesquisas do fungo *Bd* devido ao maior registro de ocorrência do fungo associado ao declínio de anuros, seguido do ano 2015 com cerca de 20,6% (**Figura 1**). A revisão bibliográfica tem como importância o aumento da objetividade e a validade dos achados para se desenvolver um trabalho com embasamento teórico.

Na literatura analisada, após as coleta de anfíbios, os animais são soltos e outros são capturados para permanecer em terrários, se forem terrestres ou em aquários, tanques, se forem na fase larval, além do mais são também capturados ovos para garantir que certas espécies não apresentem a infecção quitridiomicose com 23,9% de ocorrência nos artigos, a intenção disso é realizar experimentos sobre possíveis temperaturas favoráveis a contaminação do fungo. Estudos de comportamento dos indivíduos em relação à infecção por *Bd* com 1,0% de ocorrência nos artigos, evidencia a susceptibilidade positiva e negativa a exposição por *Bd* com 2,1% de ocorrência nos artigos.

Para se obter o material biológico coletado com segurança para não haver ocorrência de contaminações cruzadas, existem vários tipos de metodologias para essa coleta.

Método 01: O uso de luvas estéreis ou sacos plásticos estéreis para manusear todos os indivíduos (CHENG et al, 2011);

Método 02: O uso de swabs estéreis com cerca de 58,6% de ocorrência nos artigos, onde se pode aplicar cinco vezes sobre a superfície do dorso, ventre, dedos e membranas interdigitais dos anfíbios (HYATT et al. 2007). Além disso, o mesmo método pode ser utilizado em girinos fazendo o uso de swabs

estéreis, cinco vezes em movimentos giratórios na boca de girinos com cerca de 8,6 % de ocorrência nos artigos, a boca dos girinos é queratinizada, podendo apresentar indícios de infecções por fungo *Bd* pela afinidade que ele possui à queratina presente no aparato bucal de girinos (BERGER, 1999). Esses swabs contendo material biológico pode ser armazenado em tubos de Falcon estéreis secos que podem ser conservados a 16°C com cerca de 36,9% de ocorrência dessa prática nos artigos, também pode ser armazenado em tubos de Falcon estéreis sendo conservados em álcool à 10% com cerca de 29,3% de ocorrência dessa prática nos artigos (ex: LAMBERTINI *et al.*, 2013).

Existem diversas técnicas que permitem um diagnóstico de acordo com o objetivo do estudo.

Técnica 01: Obter material biológico através de enxague em água estéril com 11,9% de ocorrência nos artigos, essa técnica permite eliminar microbiota residente na pele dos anfíbios como bactérias não transitórias (LAUER *et al.*, 2007), esse material obtido através dessa técnica também pode ser conservado em baixas temperaturas, para depois realizar incubação em emplacamento em uma futura análise;

Técnica 02: Para a realização de experimentos *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana de isolado de *B. dendrobatidis* com 14,1% de ocorrência nos artigos (LONGCORE *et al.*, 1999) nos permite realizar comparações com outros estudos para se detectar agentes antimicrobianos contra *B. dendrobatidis*. Para isso é necessário que se obtenha o cultivo do *Bd* armazenado para realizar semeio em placas para o crescimento do mesmo, sendo utilizado o meio ágar triptona para o isolamento de microrganismos mais exigentes com 35,8% de ocorrência nos artigos onde fornece nutrição ideal para o esse tipo de fungo; além disso, também existe o meio TGhL que é composto por triptona, hidrolisados de gelatina e lactose, essa junção resulta em um melhor crescimento de *Bd*, porém não foi muito amostrado com apenas 8,6% de ocorrência nos artigos;

Técnica 03: O cultivo de bactérias que inibe o crescimento do fungo *Bd* também tem sido destacado com 8,6% de ocorrência nos artigos, uma metodologia que procura a solução contra a infecção causada pelo *Bd* a espécies de anfíbios vulneráveis, atualmente estão realizando experimentos *in vitro* com a bactéria *Janthinobacterium lividum*, onde foi observado que cargas exacerbadas dessa bactéria no tegumento dos anfíbios está diminuído a infecção quitridiomicose, pois elas sobrevivem a exposição ao fungo, o que pode proteger os anfíbios da infecção e da disseminação (BLACK, 2008; BRUCKER *et al.*, 2008);

Técnica 04: O semeio das cepas do *Bd* também pode ser realizado com swabs conservados em baixas temperaturas para análises moleculares, podendo usar os mesmos meios de ágar para fazer o cultivo do fungo *Bd*. Após o semeio e o crescimento do fungo é possível realizar a extração de ácidos nucleicos (DNA) com cerca de 57,6% de ocorrência nos artigos onde segundo (BOYLE *et al.*, 2004) é adicionado 50 µL do reagente PrepMan ULTRA (Applied Biosystems) a cada amostra biológica, deve-se agitar em um vórtex por cerca de 30 a 45 segundos, seguindo centrifugando por 30 segundos e novamente voltar a agitar no vórtex, sendo aquecido em banho de água fervente por cerca de dez minutos e a seguir resfriar em temperatura ambiente por cerca de dois minutos voltando a centrifugar por um minuto a 12.000 RPM, depois de toda essa etapa da preparação da diluição de 1:10 esse material genético é estocado, podendo esse diluído ser utilizado em reações de qPCR segundo Goka *et al* (2009) que descreveu esse método alternativo;

Técnica 05: O PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real, com cerca de 65,2% de presença nos dados dos artigos, permite a amplificação do DNA, de acordo com ANNIS *et al.* (2004) que criou um protocolo que utiliza *primers* específicos ao fungo *Bd*, esses *primers* são conhecidos como **Bd1a** (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') e **Bd2a** (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), para cada reação é preparado um mix contendo 1 µM de cada primer, 1XTaq Buffer, 0.2 mM de cada dNTP, MgCl₂ (0.9 mM), e 0.8 U de Taq Polymerase. Além disso, é adicionada a reação o controle negativo de água destilada e seguindo para a amplificação devendo

ocorrer a desnaturação inicial com 93°C durante 10 minutos, seguindo de 30 ciclos cada um por cerca de 45 segundos em temperatura de 93°C, após realizar esse procedimento é também realizada em temperaturas e tempos diferente como a 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, e como expansão final a 72°C por cerca de 10 minutos. A reação de PCR amplificada deverá ser avaliada em gel de agarose 0,7%, junto ao DNA *ladder* apresentando tamanho padrão de DNA. O gel é corado com brometo de etídio para se visualizar em um transluminador de luz ultravioleta. Tendo resultado positivo para Bd quando as bandas de amplificação forem visualizadas com aproximadamente 300 pb (BERGER *et al.*, 1999);

Técnica 06: O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com cerca de 41,3% de ocorrência na buscas de dados, onde para realizar a reação de quantificação é necessário utilizar alguns padrões como a **suspensão da cultura de Bd** que são cultivadas em placas com Agar Triptona 1% segundo LONGCORE *et al.* 1999; VIEIRA & TOLEDO, 2012, culturas que são mantidas em estufa por cerca de 7 dias a 21° C, sendo analisada a atividade que os zoósporos realizam, é possível adicionar 10 mL de água MilliQ nas placas por 30 minutos aguardando os zoósporos flutuarem na solução livremente, para se obter conteúdo em tubos, é extraído a solução através de raspagem das placas com os zoósporos, esse tubos são agitados por 25 segundos, e a suspensão é obtida por auxilio de seringa que irá coletar a suspensão que em seguida será filtrada por meio de filtros de membrana, sendo o filtrado transferido para outro tubo, que será possível realizar a **contagem de zoósporos**, onde se pode adquirir a concentração da suspensão desses zoósporos para o resultado da reação de quantificação, através da preparação da solução v/v com o volume final, essa solução contém a suspensão de zoósporos e o iodo a 2% que irá ocasionar a morte e a coloração após 10 minutos de espera. Sendo essa solução preenchida em um hemocitômetro para se realizar a contagem dos zoósporos por quadrados existentes na câmara de Neubauer; após a contagem dos zoósporos, ocorre a etapa da **extração de DNA para os padrões quantitativos**, que permite que esses zoósporos sejam centrifugados a 12.000 RPM por cerca de 10 minutos, removendo o sobrenadante e novamente suspenso em 100 µL de PrepMan

Ultra (Applied Biosystems), sendo agitado em vórtex por cerca de 45 segundos , voltando a centrifuga por alguns segundos, a suspensão deve ser fervida por 10 minutos e resfriada por 2 minutos voltando a ser agitada em vórtex e centrifugada por 5 minutos a 12.000 RPM; após a extração, a suspensão fica concentrada não contendo os zoósporos e sim o material genético extraído do fungo *Bd* em 1 µL sendo considerado como o **padrão de estoque**; com a concentração da suspensão é realizada a **diluição do padrão de estoque** para se construir uma curva padrão através do padrão de estoque que preparará os padrões de trabalho em diluições em série que devem chegar até a concentração de 0,02 µL⁻¹ sendo detalhado como padrão de trabalho 10⁻¹, daí pode-se obter padrões de trabalho com concentrações de 10³, 10², 10¹ e 10⁻¹ µL.

Após a diluição, deve-se se montar a placa de reação com a primeira fileira contendo 5 µL por poço de cada padrão diluído. O primeiro poço deve conter uma solução padrão 10³ g.e., seguido dos padrões 10², 10¹ e 10⁻¹ g.e. As últimas duas concentrações (1 e 10⁻¹) devem ser adicionadas em duplicata. O último poço deve conter 5 µL de água livre de nucleases como controle negativo; com a **extração de DNA a partir de swabs** pode-se realizar a **reação de qPCR**, utilizando uma placa de 96 poços para preparar um “*reaction master mix*” que contém 1250 µL de Taqman Master Mix (Applied Biosystems), 125 µL do *primer* de BOYLE *et al.* 2004, que utilizou o *primer* ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3'), *primer* Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3') e (5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3') concentrados, a seguir é adicionado 20 µL do mix em cada poço da placa, e adicionar 5 µL do DNA extraído e diluído 1:10. É preparado também o controle negativo sem DNA no último poço da primeira coluna da placa, seguindo adicionando os padrões nas diluições 10³, 10², 10¹ e 10⁻¹ g.e., para a construção da curva é utilizado a cepa de *Bd*, podendo ocorrer variação do qPCR , através da carga de infecção de acordo com a cepa do *Bd* (LONGO *et al.* 2013);

Técnica 07: A Identificação visual com cerca de 26,0% de ocorrência nos artigos científicos, essa metodologia permite a observação em lupa estereoscópica para detectar a presença de zoosporângios no tecido do aparelho bucal de girinos de acordo com o protocolo de VIEIRA & TOLEDO

(2012), é possível observar no aparato bucal a perda de queratina ou a se ocorreu à despigmentação no bico córneo dos girinos, essas detecções podem sim estar relacionado com a infecção quitridiomicose, essa metodologia também permite a identificação de *Bd* através de cortes de tecido do aparato bucal de girinos ou do tecido de adultos, onde se permite visualizar a presença de zoosporângios nos tecidos sendo retratada com 4,3% nos artigos científicos, sendo esses tecidos conservados em Formalina com cerca de 1% de ocorrência nos artigos;

Técnica 08: Os tecidos de animais conservados em formol a 10% ou etanol à 70% podem contribuir para a detecção do quítridio que possui afinidade a queratina; a pele apresenta a camada queratinizada que é propício para a infecção por quítridio, diante disso, são realizadas secções histológicas de tecidos preservados, seguindo da desnaturação do tecido através da imersão do tecido em soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes como o álcool à 70%, álcool à 80%, álcool à 85%, álcool à 90%, álcool à 95%, álcool à 100%, Xilol I e Xilol II, durante 30 minutos cada tipo de solução (TOLEDO *et al.* 2006). A seguir o tecido é embebidos em parafina, e seccionado a 5 µm e corado com hematoxilina e eosina (DRURY& WALLINGTON, 1980). As análises histológicas permitem observar a morfologia do zoosporângio contendo zoósporos em seu interior bem como a papila de descarga. Além disso, podem-se detectar na superfície epidérmica irregularidades características de infecção por quítridio podendo ser examinados a x400 ou x1000 no microscópio (BERGER *et al.*, 1999);

As análises dos dados estatísticos também foram muito trabalhadas nos artigos analisados, fazer comparações com áreas diferentes com a infecção por *Bd*, tendo maior significância à modelagem pelo programa R seguido da técnica de variância ANOVA.

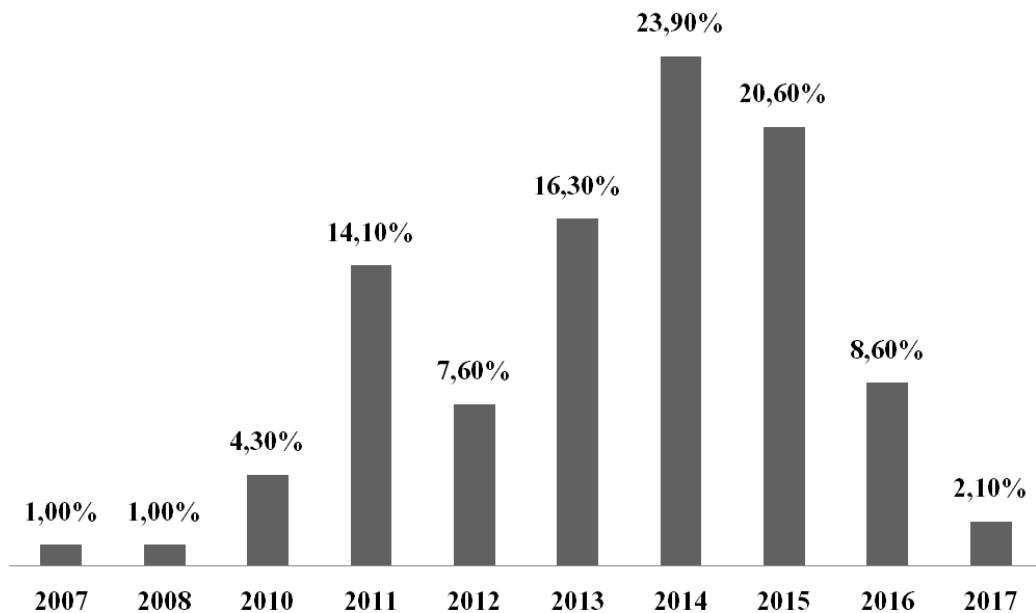


Figura 1: Maior ocorrência de publicação entre os anos 2007 à 2017, sobre *Batrachochytrium dendrobatidis*.

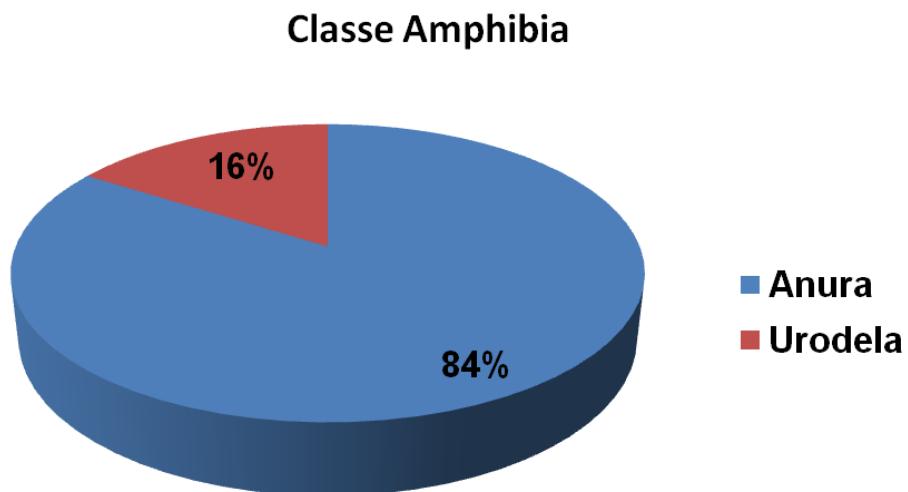


Figura 2: Abundância das ordens da classe Amphibia analisadas em artigos científicos.

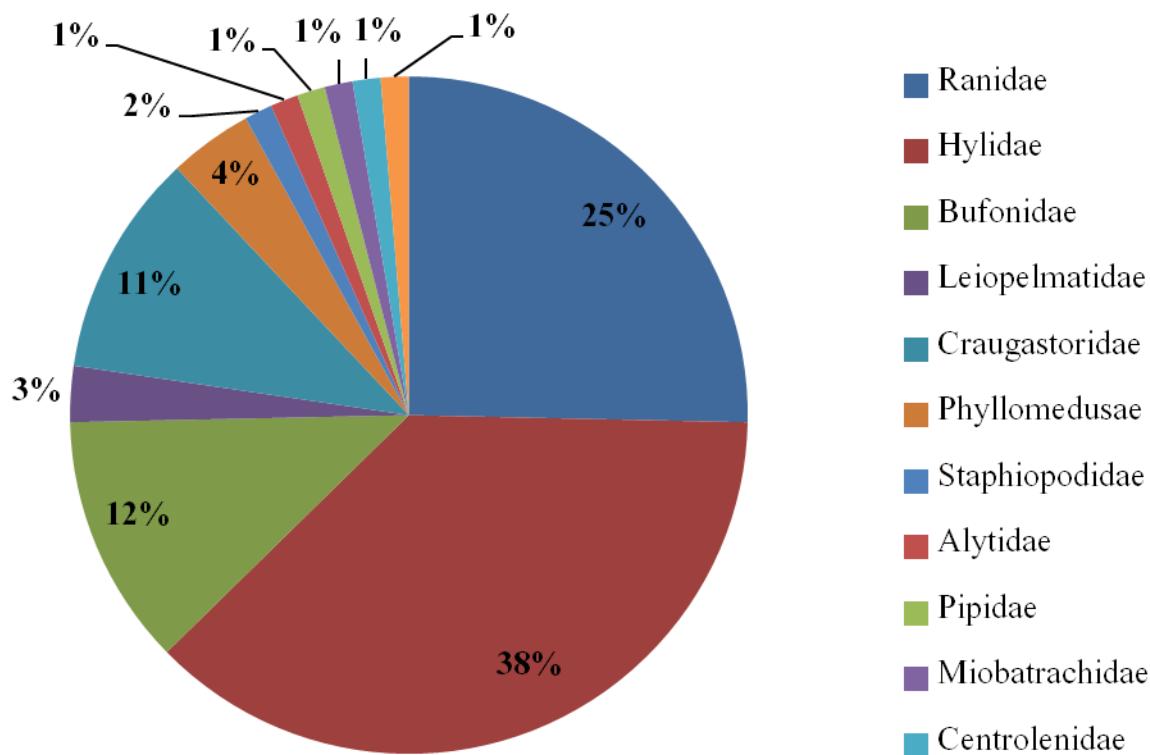


Figura 3: Abundância das famílias das espécies da ordem Anura analisadas em artigos científicos.

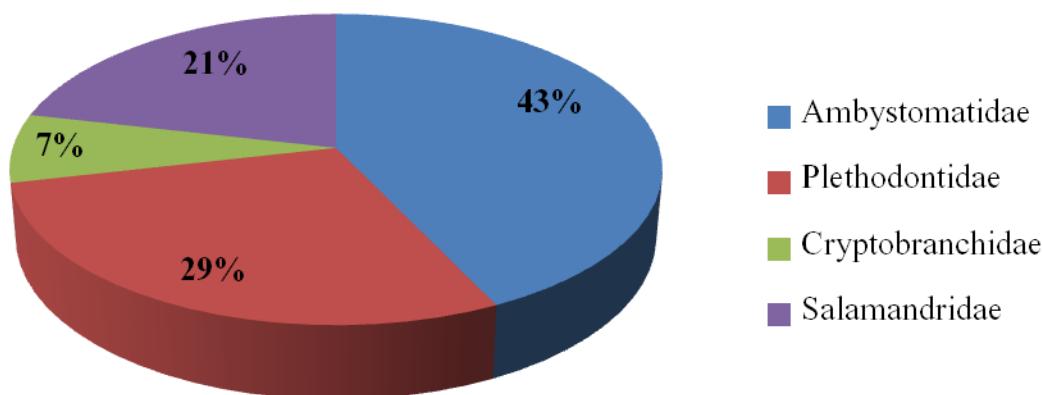


Figura 4: Abundância das famílias das espécies da ordem Urodela analisadas em artigos científicos sobre o *Bd*.

Tabela I: Lista das Espécies acometidas pelo fungo *Bd*, presentes na análise dos artigos científicos bibliográficos, entre o período de 2007 a 2017

Espécies	FILO CHORDATA		Nº de indivíduos por espécies	Porcentagem
	Subfamília	Classe Amphibia (Anura)		
Família Ranidae				
<i>Lithobates sphenocephalus</i> (Cope, 1889);	---	4	4,3%	
<i>Rana muscosa</i> (Camp, 1917);	---	3	3,2%	
<i>Rana sierrae</i> (Camp, 1917);	---	3	3,2%	
<i>Rana cascadae</i> (Slater, 1939);	---	4	4,3%	
<i>Rana aurora</i> (Baird & Girard, 1852);	---	2	2,1%	
<i>Lithobates palustris</i> (LeConte, 1825);	---	1	1,0%	
<i>Rana boylii</i> (Baird, 1854);	---	1	1,0%	
<i>Rana draytonii</i> (Baird & Girard, 1852);	---	1	1,0%	
<i>Lithobates clamitans</i> (Latreille, 1801);	---	5	5,4%	
<i>Lithobates pipiens</i> (Schreber, 1782);	---	5	5,4%	
<i>Lithobates montezumae</i> (Baird, 1854);	---	1	1,0%	
<i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802);	---	4	4,3%	

Lithobates blairi (Mecham, Littlejohn, Oldham, Brown & Brown, 1973);
Rana pretiosa (Baird & Girard, 1853);
Lithobates berlandieri (Baird, 1859);
Lithobates vaillanti (Brocchi, 1877);
Lithobates sylvaticus (LeConte, 1825);
Pelophylax kl. esculentus (Linnaeus 1758);
Pelophylax lessonae (Camerano, 1882).

Família Hylidae

Pseudacris crucifer (Wied-Neuwied, 1838);
Dryophytes eximius (Baird, 1854);
Acris crepitans (Baird, 1854);
Dryophytes chrysoscelis (Cope, 1880);
Litoria genimaculata (Horst, 1883);
Litoria serrata (Andersson, 1916);
Litoria rheocola (Liem, 1974);
Dryophytes arenicolor (Cope, 1866);
Litoria nannotis (Andersson, 1916);
Charadrahyla taeniolatus (Günther, 1901);
Ecnomiohyla miotympanum (Cope, 1863);

---	1	1,0%
---	1	1,0%
---	1	1,0%
---	1	1,0%
---	4	4,3%
---	1	1,0%
---	2	2,1%
---	5	5,4%
---	6	6,5%
---	2	2,1%
---	4	4,3%
---	1	1,0%
Pelodryadine	2	2,1%
---	1	1,0%
---	1	1,0%
---	2	2,1%
---	1	1,0%
---	1	1,0%

<i>Pseudacris triseriata</i> (Wied-Neuwied, 1838);	---	1	1,0%
<i>Litoria peronii</i> (Tschudi, 1838);	---	1	1,0%
<i>Litoria booroolongensis</i> (Moore, 1961);	---	1	1,0%
<i>Litoria lorica</i> (Davies & McDonald, 1979);	---	1	1,0%
<i>Pseudacris regilla</i> (Baird & Girard, 1852);	---	3	3,2%
<i>Litoria caerulea</i> (White, 1790);	---	3	3,2%
<i>Duellmanohyla soralia</i> (Wilson & McCranie, 1985);	---	1	1,0%
<i>Plectrohyla dasypus</i> (McCranie & Wilson, 1981);	---	1	1,0%
<i>Plectrohyla exquisite</i> (McCranie and Wilson, 1998);	---	1	1,0%
<i>Ptychohyla hypomykter</i> (McCranie & Wilson, 1993);	---	1	1,0%
<i>Pseudacris feriarum</i> (Baird, 1854);	---	1	1,0%
<i>Litoria raniformis</i> (Keferstein, 1867);	---	1	1,0%
<i>Dendropsophus ebraccatus</i> (Cope, 1874);	---	1	1,0%
<i>Litoria lesueuri</i> (Duméril and Bibron, 1841);	---	1	1,0%
<i>Scinax acuminatus</i> (Cope, 1862);	---	1	1,0%
<i>Dryophytes chrysoscelis</i> (Cope, 1880).	---	1	1,0%
Família Bufonidae			
<i>Rhinella marina</i> (Linnaeus, 1758);	---	1	1,0%

<i>Incilius perplexus</i> (Taylor, 1943);	---	1	1,0%
<i>Incilius valliceps</i> (Wiegmann, 1833);	---	2	2,1%
<i>Anaxyrus americanus</i> (Holbrook, 1836);	---	3	3,2%
<i>Anaxyrus fowleri</i> (Hinckley, 1882);	---	1	1,0%
<i>Anaxyrus terrestris</i> (Bonnaterre, 1789);	---	1	1,0%
<i>Anaxyrus boreas</i> (Baird & Girard, 1852);	---	4	4,3%
<i>Anaxyrus woodhousii</i> (Girard, 1854);	---	1	1,0%
<i>Atelopus varius</i> (Lichtenstein & Martens, 1856).	---	1	1,0%
Família Leiopelmatidae			
<i>Leiopelma archeyi</i> (Turbott, 1942);	---	2	2,1%
<i>Leiopelma hochstetteri</i> (Fitzinger, 1861).	---	2	2,1%
Família Craugastoridae			
<i>Craugastor berkenbuschii</i> (Peters, 1870);	---	1	1,0%
<i>Craugastor loki</i> (Shannon & Werler, 1955);	---	1	1,0%
<i>Craugastor mexicanus</i> (Brocchi, 1877);	---	1	1,0%
<i>Craugastor rhodopis</i> (Cope, 1867);	---	1	1,0%
<i>Craugastor pygmaeus</i> (Taylor, 1937);	---	1	1,0%
<i>Craugastor ranoides</i> (Cope, 1886);	---	1	1,0%
<i>Craugastor fitzingeri</i> (Schmidt, 1857);	---	2	2,1%
<i>Pristimantis variabilis</i> (Lynch, 1968).	---	1	1,0%

Família Phyllomedusidae

Agalychnis moreletii (Duméril, 1853);

Agalychnis dacnicolor (Cope, 1864);

Agalychnis callidryas (Cope, 1862).

---	2	2,1%
---	1	1,0%
---	2	2,1%

Família Scaphiopodidae

Scaphiopus holbrookii (Harlan, 1835).

---	1	1,0%
-----	---	------

Família Alytidae

Alytes muletensis (Sanchiz & Adrover, 1979).

---	2	2,1%
-----	---	------

Família Pipidae

Xenopus laevis (Daudin, 1802).

---	2	2,1%
-----	---	------

Família Miobatrachidae

Mixophyes fasciolatus (Günther, 1864).

---	1	1,0%
-----	---	------

Família Centrolenidae

Hyalinobatrachium fleischmanni (Boettger, 1893).

---	1	1,0%
-----	---	------

Família Limnodynastidae

Limnodynastes peronii (Duméril and Bibron, 1841).

---	1	1,0%
-----	---	------

Classe Amphibia (Urodela)

Família Ambystomatidae

Ambystoma macrodactylum (Baird, 1850);

---	2	2,1%
-----	---	------

Ambystoma maculatum (Shaw, 1802);

---	1	1,0%
-----	---	------

Ambystoma texanum (Matthes, 1855);

---	1	1,0%
-----	---	------

<i>Ambystoma opacum</i> (Gravenhorst, 1807);	---	1	1,0%
<i>Ambystoma laterale</i> (Hallowell, 1856).	---	1	1,0%
<i>Ambystoma mexicanum</i> (Shaw & Nodder, 1798).	---	1	1,0%
Família Plethodontidae			
<i>Plethodon cinereus</i> (Green, 1818);	---	2	2,1%
<i>Eurycea bislineata</i> (Green, 1818);	---	1	1,0%
<i>Bolitoglossa platydactyla</i> (Gray, 1831);	---	1	1,0%
<i>Batrachoseps attenuatus</i> (Eschscholtz, 1833).	---	2	2,1%
Família Cryptobranchidae			
<i>Cryptobranchus alleganiensis</i> (Daudin, 1803).	---	2	2,1%
Família Salamandridae			
<i>Notophthalmus viridescens</i> (Rafinesque, 1820);	---	1	1,0%
<i>Salamandra salamandra</i> (Linnaeus, 1758);	---	2	2,1%
<i>Ichthyosaura alpestris</i> (Laurenti, 1768).	---	1	1,0%

Tabela II: Metodologias Utilizadas em Artigos Científicos para a Identificação do Fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Categorias	Porcentagem
Métodos de Coleta aos Anfíbios	
Armadilha de <i>Minnow</i>	3,2%
Armadilha de <i>Ptfall</i>	2,1%
Busca ativa	13,0%
Procedimentos em Terrários e Aquários	
Permanência de anuros adultos, larvas e ovos em terrários	23,9%
Estudo de susceptibilidade positiva ou negativa	2,1%
Estudo de comportamento dos anuros em relação à infecção por <i>Bd</i>	1,0%
Procedimentos da Coleta de Material Biológico	
Esfregaço com swabs no dorso	58,6%
Esfregaço com swabs na boca	8,6%
Conservado em baixas temperaturas	36,9%
Conservados em álcool	29,3%
Técnica de enxague em água estéril	11,9%
Procedimentos Moleculares	
Experimentos in vitro de isolado de <i>Bd</i>	14,1%
Meio Ágar triptona	35,8%
Meio TGhL (Triptona, Hidrolisado de gelatina, e lactose)	8,6%
Cultivo de bactérias inibidoras de <i>Bd</i>	8,6%
Extração de DNA	57,6%
PCR tempo real	65,2%
qPCR	41,3%
Procedimentos Histológicos	
Técnica visual	26,0%

Análise direta de tecidos em microscópio
Conservados em formalina

4,3%
1,0%

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem métodos variados que se pode chegar ao diagnóstico do *Bd*, porém a escolha do melhor método vai depender da situação em que foi coletada a amostra que será analisada. As análises histológicas chegam ao diagnóstico, mas também geram resultados com falsos negativos, quando o tecido estudado apresenta uma infecção inicial, que não chega a ser percebido. KRIGER *et al*, 2006, relatou que isso ocorre quando a carga da infecção é muito baixa. Por isso é preciso repensar qual tipo de método utilizar que promova um resultado preciso e rápido, para isso existe as análises moleculares que permite um resultado mais rápido do que as técnicas da histologia que demandam um maior tempo de preparação e um bom conhecimento de análise na histologia.

A histologia permite o diagnóstico de espécies conservadas em etanol ou formalina e também permite o diagnóstico de espécies vivas após a retirada da falange para análises (PENNER *et al*, 2013), essa técnica permite a preservação de espécies em grau de ameaça muito elevado, mas também pode apresentar resultados reduzidos em questão da infecção.

HYATT *et al*, 2007, retrata o PCR em tempo real e o qPCR como métodos muito sensíveis ao diagnóstico pois permite que seja detectado cargas de infecção no tegumento muito baixas, principalmente em espécies que não apresentem sintomas nenhum da quitridiomicose. Porém são técnicas letais aos anuros, o que não seria viável devido ao declínio dos anfíbios. As técnicas de PCR e amostras histológicas são exemplos de técnicas letais.

As técnicas não invasivas são as mais aconselháveis para a conservação dos anfíbios, como: a obtenção do material biológico através do swabs, para a realização de cultivo de fungos e bactérias em vitro, para detecção de *Bd* por técnicas moleculares.

A escolha da melhor metodologia vai variar de acordo com a situação da espécie de anfíbio, da disponibilidade de tempo e até a questão financeira pra realização desses métodos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANNIS, S.L., DASTOOR, F.P., ZIEL, H., DASZAK, P. & LONGCORE, J.E. (2004). Um ensaio baseado em DNA identifica *Batrachochytrium dendrobatidis* em anfíbios. *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 420-428.
- BERGER, L, SPEARE, R., KENT, A. (1999). Diagnóstico de quitridiomicose em anfíbios por exame histológico. Arquivo da World Wide Web, <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>.
- PRETO, R. (2008). "Bactéria poderia parar o assassino de rã" Acessado em 7 de junho.
- BOYLE, D.G., BOYLE, D.B., OLSEN, V., MONGAN, J. A. e HYATT, A. D. (2004). Detecção quantitativa rápida de quitridiomicose (*Batrachochytrium dendrobatidis*) em amostras de anfíbios utilizando o ensaio de PCR Taqman em tempo real. *Doenças dos organismos aquáticos*, 60: 141- 148.
- BUCK, J. C., TRUONG, L. & BLAUSTEIN, A. (2011). Predação por zooplâncton em *Batrachochytrium dendrobatidis*: controle biológico do fungo mortal de quitrídio anfíbio? *Biodivers Conserv*, 20: 3549-3553.
- BRUCKER, R.M., HARRIS, R.N., SCHWANTES, C.R., GALLAHER, T.N., FLAHERTY, D.C., LAM, B.A., MINBIOLE, K.P. (2008). Defesa química de anfíbios: metabólitos antifúngicos do microssimbionte *Janthinobacterium lividum* na salamandra *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* 34 (11): 1422-9. PMID 18949519. doi: 10.1007 / s10886-008-9555-7.
- CHENG, T.L., ROVITO, S.M., WAKE, D.B., VREDENBURG, V. T., (2011). Extirpação em massa coincidente de anfíbios neotropicais com o surgimento do patógeno fúngico infeccioso *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9502-9507.
- DIEMER, M.; SCHMID, B. (2001). Effects of biodiversity loss and disturbance on the survival and performance of two *Ranunculus* species with differing clonal architectures. *Ecography*, Lund, v. 24, p. 59-67.
- DRURY, R. B. & WALLINGTON, E. A. (1980) Técnica Histológica de Carleton. Oxford University Press, Pp 520.
- GARMIN, A., VAN, R.P., PASMANS, F., HELLEBUYCK, T., VAN, D.B. W., et al. (2012). Aves aquáticas: potenciais reservatórios ambientais do fungo Chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE* 7 (4): e35038.

HYATT, A. D., BOYLE, D.G., OLSEN, V., BERGER, L., OBENDORF, D., DALTON, D., KRIGER, K., HERO. A., HINES, H., PHILLOT, CAMPBELL, R., MARANTELLI, G., GLEASON, F. & COLLING, A. (2007). Ensaios diagnósticos e protocolos de amostragem para a detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Doenças dos organismos aquáticos, 73: 175-192.

IUCN 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 23 February 2015.

KOLBY, J. E., RAMIREZ, S. D., BERGER, L., RICHARDS-HRDICKA, K.L., JOCQUE, M., SKERRATT, L.F (2015) Dispersão Terrestre e Potencial de Transmissão Ambiental do Fungo de Chytrid de Anfíbio (*Batrachochytrium dendrobatidis*). PLoS ONE 10 (4): e0125386. doi: 10.1371/journal.pone.0125386.

KRIGER, K. M., HINES, H. B., HYATT, A. D., BOYLE, D. G. & HERO, J. M. (2006). Técnicas para detecção de quitridiomicose em rãs selvagens: comparando a histologia com a PCR Taqman em tempo real Doenças dos organismos aquáticos, 71: 141- 148.

LAMBERTINI, C., RODRIGUEZ, D., BRITO, F.B., LEITE, D.S., TOLEDO, L.F. (2013). Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Herpetologia Brasileira - Volume 2 - Número 1.

LONGCORE, J.E., PESSIER, A.P., NICHOLS, D.K., (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., um quitrídio patogênico para anfíbios. Mycologia 91, 219-227.

MCMAHON, T.A., BRANNELLYB, L.A., CHATFIELDB, M.W., JOHNSONC, P.J., JOSEPHC, M.B., MCKENZIEC, V.J., RICHARDS-ZAWACKIB, C.L., VENESKYA, M.D., & ROHRA, J.R .. (2013). O fungo Chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* possui hospedeiros não anfíbios e libera substâncias químicas que causam patologia na ausência de infecção. PNAS 7 (4): e35038.

MOYLE, P. B.; WILLIAMS, J. E. (1990). Biodiversity Loss in the Temperate Zone - Decline of the Native Fish Fauna of California. Conserv. Biol., Gainesville, v. 4, p. 275-284.

PENNER, J., ADUM, G. B., MCELROY, M. T., DOHERTY-BONE, T., HIRSCHFELD, M., SANDBERGER, L., WELDON, C., CUNNINGHAM, A. A.,

OHST, T., WOMBWELL, E., PORTIK, D.M., REID, D., HILLERS, A., OFORI-BOATENG, C., ODURO, W., PLÖTNER, J., OHLER, A., LEACHE, A. D. e RÖDEI, M. O. (2013). África Ocidental - Um porto seguro para os sapos? Avaliação subcontinental do fungo quitrídio (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Plos One, 8 (2): e56236.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. (2001). Biologia da Conservação. 3. ed. Londrina: Midiograf.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA - SBH. (2016). Lista de anfíbios do Brasil. <http://www.sbherpetologia.org.br / lista / anfibios.htm> (Último Acesso em 28/11/2018).

TOLEDO, L. F., C. F. B. HADDAD. A. C. O. Q. CARNAVAL e F. B. BRITTO. (2006). Um anuro brasileiro (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infectado por *Batrachochytrium dendrobatidis*: uma preocupação de conservação. Conservação de Anfíbios e Répteis, 4: 17-21.

VIEIRA, C. A. e L. F. TOLEDO. (2012). Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Herpetologia Brasileira, 1: 18-19.

Capítulo III

*Fungos filamentosos associados a comunidade de
anfíbios anuros no Parque Estadual Dois Irmãos,
Recife- PE*

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são heterotróficos unicelulares ou pluricelulares, podendo apresentar estruturas filamentosas, como as hifas, que constituem o micélio. Os fungos desenvolvem-se nos mais diversos ambientes aquáticos e terrestres. Mesmos ambientes que os vertebrados habitam, sendo expostos a condições que comprometem a integridade física.

Os anfíbios são um grupo de vertebrados, e que apresentam uma particularidade em questões sobre exposição a problemas ambientais; aos anfíbios também apresentam o sistema imunológico pertinentes tanto para o ciclo de vida em fase aquática ou terrestre. Eles possuem a pele permeável e livre para passagens de agentes químicos e agentes biológicos do ambiente (FEDER & BURGGREN, 1992). Apresentam proteção mecânica na pele que é derivada da comunidade microbiana do ambiente que confere proteção mecânica com a secreção de moléculas bioativas a partir das glândulas dérmicas, essa junção permite a proteção dos anfíbios através dessa atividade antimicrobiana (SIMMACO *et al.*, 1998; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2002).

Com essa união de microrganismos e hospedeiros nos anfíbios contribui para a formação de microbiota cutânea residente, sendo essas microbiotas compostas por bactérias e fungos, que tem por produto final a produção de peptídeos ou antibióticos para inibir a crescimento de patógenos importantes na população de anfíbios (HARRIS *et al.*, 2006); WOODHAMS *et al.*, 2007; LAUER *et al.*, 2008; BRUCKER, 2008). De acordo com estudos foi comprovado que em maior exposição de carga da bactéria *Janthinobacterium lividum* em experimento com anuros revelou que amenizou maiores cargas da infecção do patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)*.

Populações de microrganismos podem desenvolver resistências aos antibióticos o que as capacita para viver sobre determinadas concentrações desses agentes. Deixando os anfíbios vulneráveis a diferenças interpopulacionais na susceptibilidade ao patógeno (*Bd*), considerado por declínios e extinções de anuros (FISHER *et al.*, 2009). Por outro lado, a produção de peptídeos através da união formada pela microbiota residente aos anuros contribui para a indústria farmacêutica para benefício humano, características que são essenciais nos processos adaptativos durante a ocupação de microambientes adversos (SALLE, 1961).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de Estudo

Parque Estadual Dois Irmãos, é uma Unidade de Conservação de Mata Atlântica úmida (**Figura 1-b**), localizado na Região metropolitana do Recife (8°7'30"S e 34°52'30"W), com área de 1.157,74 ha, desses, 14 ha está situado o Zoológico de Recife (**Figura 1-b**) que apresenta forte influência urbana. No fragmento de Mata foi trabalhado com módulo montado para o Programa PPBio, Mata Atlântica do Nordeste.

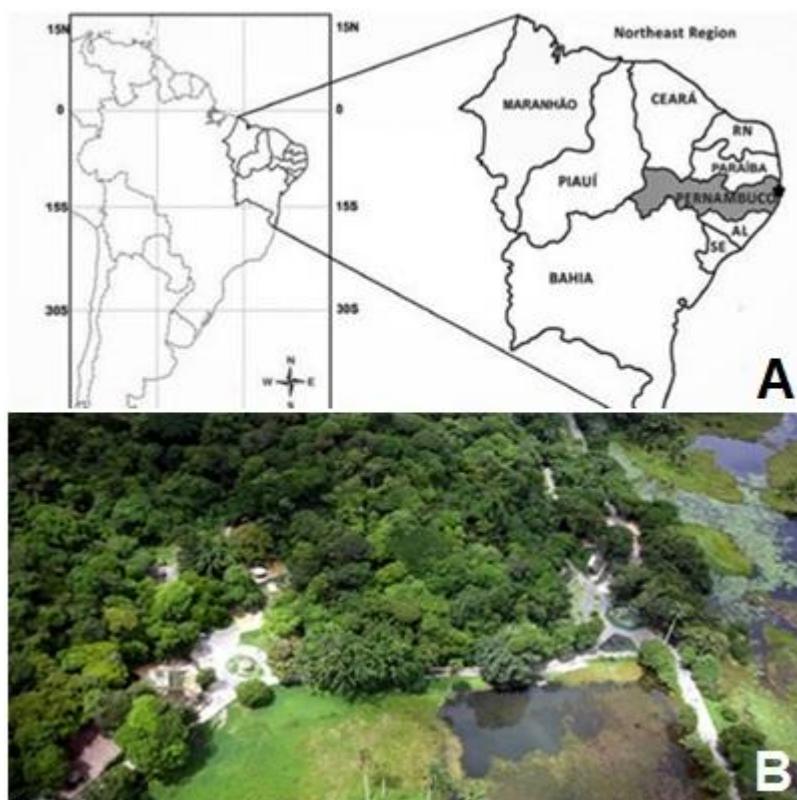


Figura 1: A- Mapa da região Nordeste, evidenciando o estado de Pernambuco em que ocorre a área de estudo; B- Mata Atlântica do Parque Estadual de Dois Irmãos – PEDI - Vista aérea da Mata de Dois irmãos, o zoológico, açude Dois Irmãos e açude do Meio. Fonte: SECTMA.

2.2. Captura e Coleta

As coletas ocorreram bimestralmente durante dez dias consecutivos, nos turnos diurnos e noturnos, no período de outubro de 2015 a abril de 2017. Seguindo o modelo de coleta do Programa de Pesquisas em Biodiversidade (PPBio) que tem como sítios amostrais grades e Módulo RAPELD (**Figura 3, Apêndice B**), com suas respectivas parcelas permanentes. Tanto as trilhas como as parcelas são unidades amostrais ou experimentais para um grande número de pesquisadores, de diferentes áreas de interesse, mas que tem em

comum o interesse na integração de seus dados com os dados de outros pesquisadores trabalhando nas mesmas unidades amostrais.



Figura 2: A- Buscas passivas realizadas através da armadilha de intercepção em queda conhecida como *pitfall* em forma de Y, B-Montagem dos *pitfalls*.
Fonte: Vanessa Nascimento.

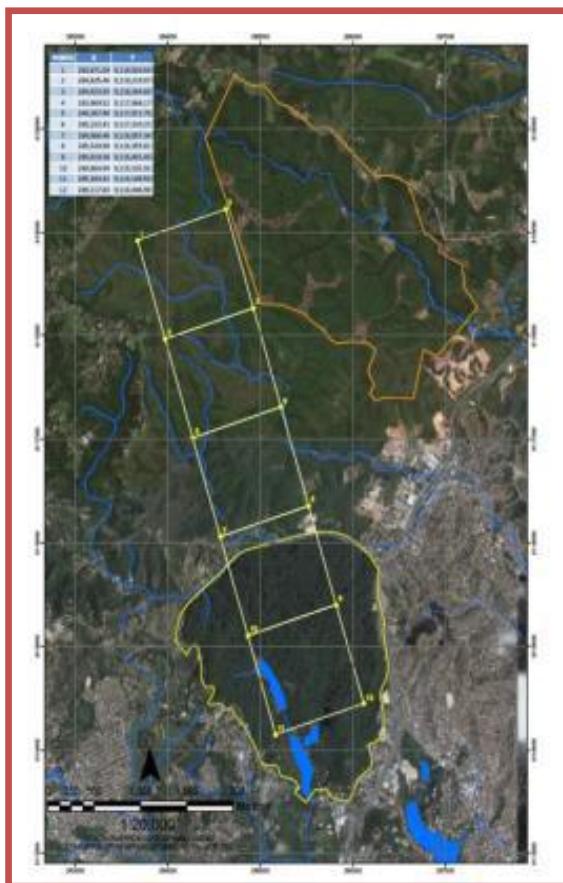


Figura 3: As pesquisas foram realizadas em parcelas tendo o módulo RAPELD montado.

Os anuros foram coletados com sacos plásticos esterilizados, individuais para cada espécime, após a coleta, foi retirado o material biológico da superfície do anfíbio, isso foi possível com o uso de swabs estéreis, aplicando-o sobre a superfície do dorso, ventre, dedos e membranas interdigitais (**Figura 4-a**). Após o esfregaço do swabs no anuro, o mesmo, foi armazenado em tubos de Falcon esterilizados e conservado em baixas temperaturas para a realização de futuras análises microbiológicas (**Figura 4-b**). Este é um método não invasivo e prático para o diagnóstico de infecção, além de ser pouco estressante para os animais (HYATT *et al.*, 2007). Além da coleta do material biológico, os espécimes capturados foram identificados taxonomicamente, determinado o sexo, fotografados, submetidos à aferição de informações biométricas (comprimento do corpo e peso), bem como registro onde o espécime foi capturado e uma breve descrição do seu microhabitat.

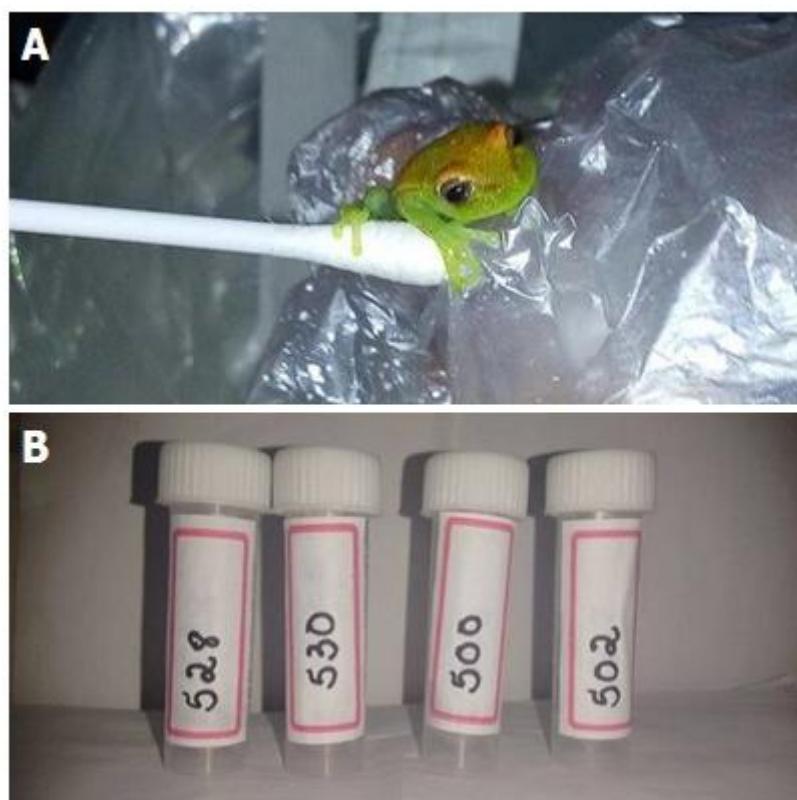


Figura 4: A- Coleta de Material Biológico com o swabs em uma *Hypsiboas atlanticus* (Caramaschi e Velosa, 1996); B-Tubo de Falcon com o material biológico armazenado, com identificações de cada indivíduo.

2.3. Análise Microbiológica

No Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco foi realizado o cultivo do material biológico de 32 indivíduos de anuros. Foram utilizados 65,0g de Ágar Sabouraud a 4% de Glicose que fornece melhores nutrientes para fungos filamentosos, o ágar foi dissolvido em 1000 mL de água destilada com o auxílio de um bastão de vidro, mexendo todo o meio dentro do Becker de 1L. O Ágar é gelatinoso e contém nutrientes que ajudam a promover o crescimento mais vigoroso na cultura de bactérias e fungos. Após a diluição do Ágar Sabouraud, o líquido gelatinoso foi transferido para um Erlenmeyer de 1000 ml e levado para a autoclave, onde foi possível ocorrer esterilização, matando todos os microrganismos presentes no material. Ficando na autoclave por cerca de 30 minutos a 120° C.

Após o processo da produção do Ágar Sabouraud, foi utilizado 64 placas de Petri descartáveis, duas repetições para cada amostra biológica. As placas têm a função de proteger o conteúdo de qualquer ar contaminado indesejado, e permite também que gases produzidos por fungos e bactérias não sejam escapados. Todas as placas foram esterilizadas, para não afetar o resultado do ensaio. A seguir foram separadas as metades das placas e

cuidadosamente foi vertida na parte inferior da placa a solução quente de Ágar Sabouraud para forrar uma camada sobre o fundo da placa, e rapidamente foi colocada a parte superior da placa para não contaminar o experimento com o ar com presença de bactérias, para não ocorrer essa contaminação a chama de fogo estava sempre próxima às placas de Petri, depois de todas as placas estarem vertidas com o Ágar, o líquido foi esfriado e se se assemelhou a uma gelatina e em seguida foi armazenado no refrigerador.

Com a solução de ágar solidificada e as placas de Petri à temperatura ambiente foi possível semear o material biológico presente nos tubos de Falcon. O material biológico foi distribuído no ágar com um *swab*, sendo esse procedimento realizado na Cabine de fluxo laminar em condições assépticas (**Figura 5-a e b**).

Todas as placas de Petri receberam identificação de seus respectivos destinos e foram incubadas a 28°C por 4 a 7 dias para a realização de análises em Microscópio óptico. Depois de alguns dias, foi possível notar uma variedade de vários fungos e algumas bactérias, crescendo dentro de cada placa de Petri (**Figura 5- d**).

Foram registradas observações sobre o conteúdo de cada placa, evidenciando com clareza a quantificação dos monofitipos por placas, obtendo dados como o tamanho das respectivas, coloração, textura e tipo de fungo; se aparentemente de forma macroscópica ele se expressava leveduriforme ou filamentoso. Essa etapa antecedeu a elaboração de lâminas para posterior observação, e foi muito importante, pois ao avaliar essas características morfológicas externas, pudemos observar a partir das repetições se houve alguma perturbação ou não, causada na coleta ou cultivo dos microrganismos.

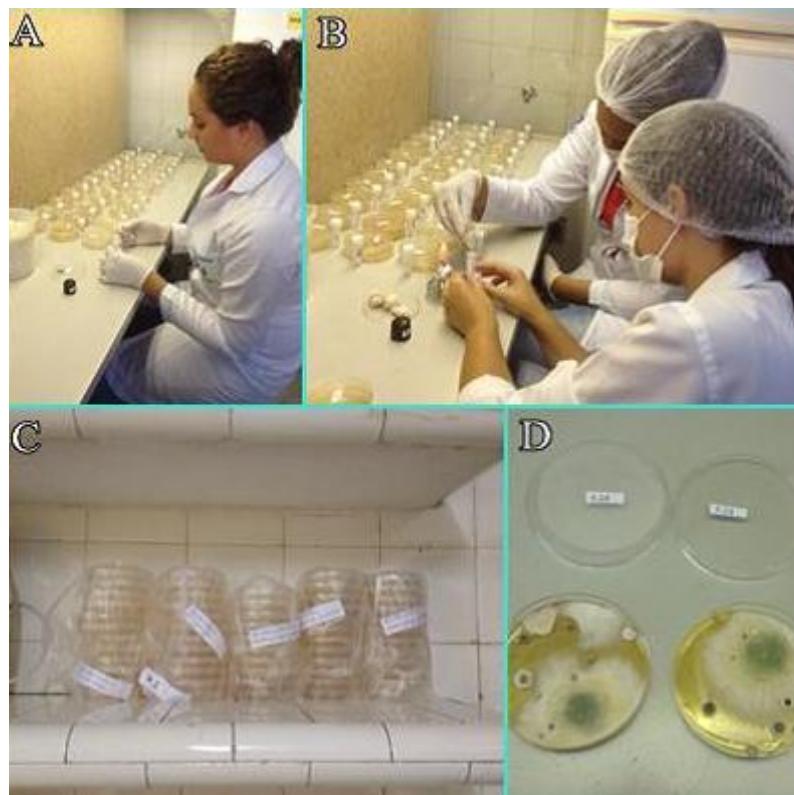


Figura 5: **A** e **B**- O material biológico sendo distribuído no ágar com um *swab*, procedimento realizado na Cabine de fluxo laminar e com chama de fogo para não contaminar o experimento; **C**-Placas de Petri empilhadas em uma prateleira para receber a iluminação para ocorrer o crescimento e **D**- Umas das amostras mostrando uma variedade de bactérias e fungos, que cresceu dentro da placa de Petri.

Após o crescimento das colônias, foram preparadas as lâminas utilizando fita durex onde era inserido um pedaço da fita levemente sobre o fungo e em seguida foi colocado a fita com o fungo sobre o corante (Azul de Amann), e a partir deste método era possível observar as estruturas dos microrganismos no microscópico óptico nas objetivas de 10 e 40 vezes (**Figura 6-a**).

Foi realizado também o micro cultivo (**Figura 6-b**), onde foi semeado o fungo em um pequeno bloco de ágar colocado sobre a lâmina em uma câmara de cultivo (placa de Petri forrada com papel filtro úmido e ambiente estéril) e após sete dias cultivados, foi possível corar e montar a lâmina para observação, e esse método permite observar estruturas intactas.

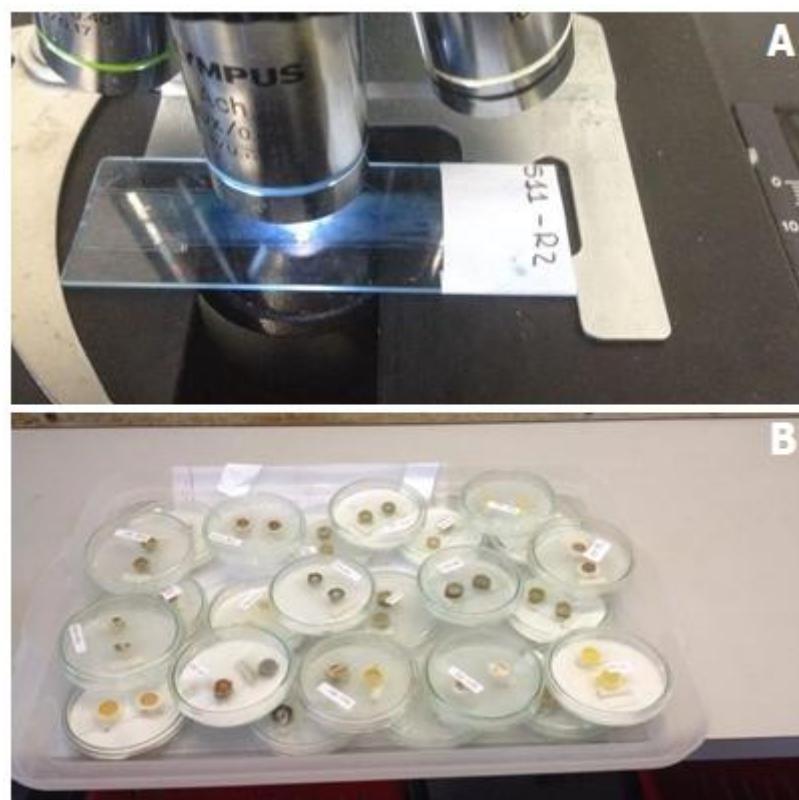


Figura 6: A- Observação de estruturas dos microrganismos no microscópico óptico; B- Método do micro cultivo que possibilita observar estruturas intactas dos microrganismos.

2.4. Composição de outros tipos de meio utilizado no semeio

Além disso, foi possível fazer repiques de alguns fungos que foram identificados à nível de gênero, em outros tipos de meios de **cultura**.

2.4.1. Meio de Batata- Dextrose-ágar (BDA):

Criado por RIKER & RIKER, 1936) apresenta em sua composição 200g de discos de batata sem pele, 20g de dextrose, 20g de ágar e 1000ml de água destilada sendo esse meio produzido através do estado de ebulação das batatas formando um caldo que será filtrado e em seguida fundido ao ágar, sendo levado à autoclave por 20 minutos formando o meio BDA.

2.4.2. O Meio Malte:

Apresenta em sua composição 20g de Sitrato de Malte, 20g de Glicose, 1g Peptona e 16g de ágar acrescentando todos os ingredientes, deixando sempre o ágar por últimos após aferir o pH e indo para a autoclave por 30 minutos.

2.4.3.O Meio Czapek (CZ):

Apresenta em sua composição 30g de sacarose, 3g de NaNo₃, 0,5g de sulfato de Mg, 0,5g de KCl (Cloreto de potássio), 1g de fosfato de potássio, (0,1g/10ml H₂O) 1 ml FeSO₄·7H₂O e 16g de ágar acrescentando todos os ingredientes, deixando sempre o ágar por últimos após aferir o pH e indo para a autoclave por 30 minutos.

Todos esses meios são específicos para que se obtenha a identificação de fungos filamentosos que estavam presentes nos anuros sendo eles analisados e identificados à nível de espécie nos laboratório de micologia da UFPE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises microbiológicas foram coletadas amostras biológicas de 32 indivíduos distribuídos em 10 espécies de anuros pertencentes à 4 famílias, são elas Hylidae (n=8), Craugastoridae (n=15), Leptodactylidae (n= 8) e a Microhylidae (n=1), dessas famílias a mais representativa foi a Craugastoridae apresentando apenas uma espécie foi o *Pristimantis ramagii* que teve abundância de 15 indivíduos, dentre essas espécies existe uma caracterizada como ameaçada de extinção que foi a espécie *Chiasmocleis alagoanus*(Tabela 1), que foram coletadas e tiveram o seu material biológico armazenado para análises laboratoriais.

Desses dados foi realizado a identificação dos fungos presentes nos 15 indivíduos de anuros, essa identificação ocorreu à nível de espécie e outros a nível de gênero, esses 15 indivíduos de anuros do estudo estão distribuídos em 7 espécies de anuros pertencentes a família Hylidae (n=4), Craugastoridae (n=6), Microhylidae (n=1) e Leptodactylidae (n=4).

Dos fungos identificados estava presente a família Trichocomaceae com as espécies de *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx) identificado em 4 espécies de anuros, *Penicillium fellutanum* identificado em 2 espécies de anuros, *Penicillium citrinum* presente em 2 espécies de anuros, *Aspergillus* sp. presentes em 2 espécies de anuros e do *Paecilomyces* sp.encontrado em 2 espécies de anuros. Da família Tremellaceae foi possível observar a nível de gênero a *Tremella* sp. encontrado em 2 espécies de anuros (Tabela 1). Nesse sentido a espécie *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx) se mostrou mais frequente entre as espécies de anuros do PEDI (Figura 8).

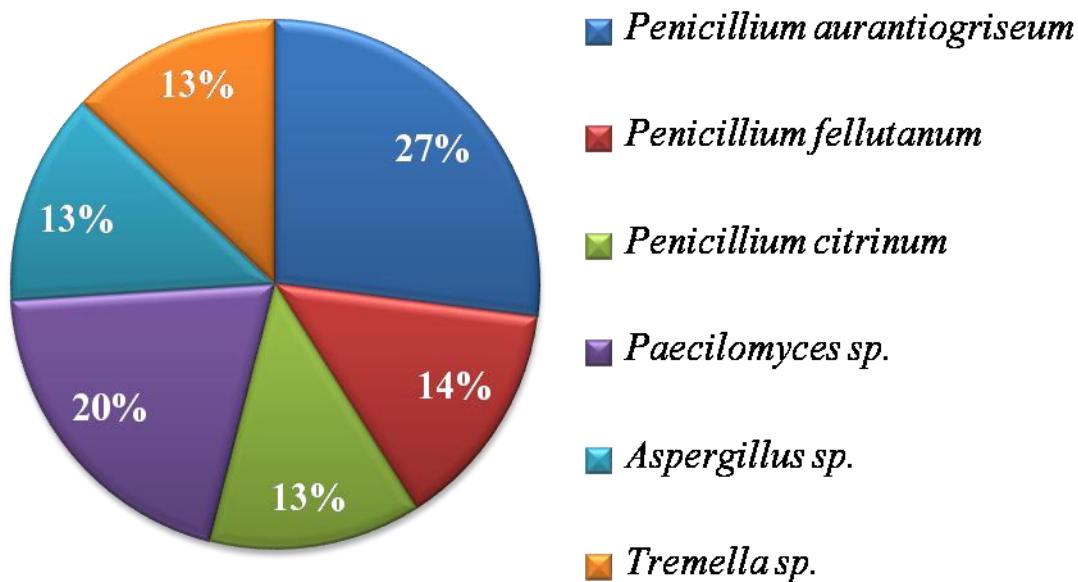


Figura 7: Abundância dos fungos encontrados nos anfíbios anuros do PEDI.

Alguns fungos presentes nos anuros coletados, foram mais encontrados frequentemente no solo como *Penicillium* sp. e *Paecilomyces* sp.; nas plantas e caules como *Aspergillus* sp. e parasitando outros fungos como *Tremellas* sp..

Nesse sentido esse trabalho se mostra promissor pelas grandes potencialidades fúngicas, que necessitam de um maior direcionamento para saber se esses fungos apresentam ou não algum tipo de patogenicidade aos anuros podendo levá-los ao declínio desse grupo.

Tabela I: Dados de diversidade das espécies de anuros coletadas e espécies de fungos encontrados no material biológico coletado dos anuros do PEDI, evidenciando o local e as parcelas do PPBio no Parque Estadual dois Irmãos, Recife-PE.

Fungos Filamentosos encontrados em anfíbios anuros

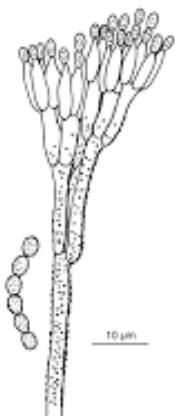
Nº de Campo	Espécies de Anuros	Família anuros	dos	Parcela	Espécies de fungos	Família	dos Fungos
494	<i>Hypsiboas semilineatus</i> (Spix, 1824);	Hylidae		PE 1-500	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		Tricomaceae
498	<i>Pristimantis ramagii</i> (Boulenger, 1888);	Craugastoridae		PE 1-500	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		Tricomaceae
499	<i>Pristimantis ramagii</i> (Boulenger, 1888);	Craugastoridae		PE 1-500	<i>Paecilomyces sp.</i>		Tricomaceae
502	<i>Chiasmocleis alagoanus</i> Cruz, Caramaschi & Freire, 1999;	Microhylidae		PE 1-500	<i>Penicillium citrinum</i>		Tricomaceae
504	<i>Pristimantis ramagii</i> (Boulenger, 1888);	Craugastoridae		PE 1-500	<i>Aspergillus sp.</i>		Tricomaceae
505	<i>Scinax eurydice</i> (Bokermann, 1968);	Hylidae		PE 1-500	<i>Penicillium citrinum</i>		Tricomaceae
508	<i>Pristimantis ramagii</i> (Boulenger, 1888);	Craugastoridae		PE 1-500	<i>Paecilomyces sp.</i>		Tricomaceae
510	<i>Pristimantis ramagii</i> (Boulenger, 1888);	Craugastoridae		PE 1-500	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		Tricomaceae
511	<i>Pseudopaludicola falcipes</i> (Hensel, 1867);	Leptodactylidae		PE 1-500	<i>Tremella sp.</i>		Tremellaceae
514	<i>Hypsiboas semilineatus</i> (Spix, 1824);	Hylidae		PE 1-500	<i>Tremella sp.</i>		Tremellaceae

	1824);					
519	<i>Hypsiboas semilineatus</i> (Spix, Hylidae 1824);		PE	2-	<i>Aspergillus</i> sp.	Tricomaceae
				1500		
526	<i>Adenomera marmorata</i> Leptodactylidae (Steindachner, 1867);	PE	1-500		<i>Paecilomyces</i> sp.	Tricomaceae
530	<i>Pristimantis ramagii</i> Craugastoridae (Boulenger, 1888);	PE	1-500		<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Levedura	Tricomaceae
22	<i>Adenomera marmorata</i> Leptodactylidae (Steindachner, 1867);	Zoológico			<i>Penicillium fellutanum</i>	Tricomaceae
13 B	<i>Leptodactylus troglodytes</i> (A. Lutz, 1926).	Leptodactylidae	PE 1-500		<i>Penicillium fellutanum</i>	Tricomaceae

3.1. Lista Descritiva da microbiota existente nas espécies de anfíbios do Parque Estadual Dois Irmãos, Recife/ PE

As espécies de *Penicillium* são moldes encontrados comumente associados com o solo, a matéria orgânica em decomposição e como pombas de armazenamento ou patógenos de frutas e vegetais. Eles são bem conhecidos por biodeterioração da matéria orgânica, por sua produção de antibióticos como penicilina e griseofulvina, metabólitos tóxicos (micotoxinas), como ocratoxina A, patulina e penitrem A em alimentos e grãos, e seus papéis protagonistas em camembert e azul Queijos.

Penicillium aurantiogriseum (Dierckx)

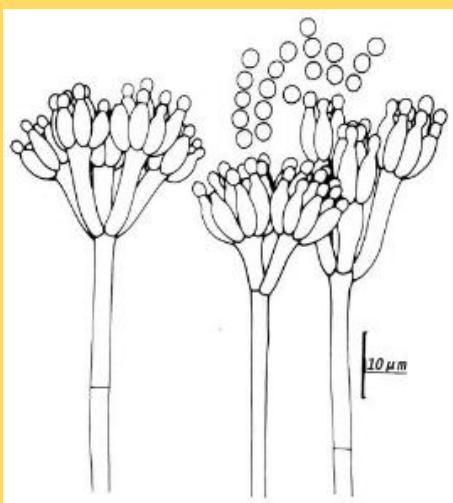


Penicillium aurantiogriseum é um agente patogénico de plantas que infecta aspargos e morangos.

Penicillium aurantiogriseum produz o anticâncer composto Anicequol.

Figura 8: Descrição do fungo *Penicillium aurantiogriseum (Dierckx)*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google.

Penicillium citrinum



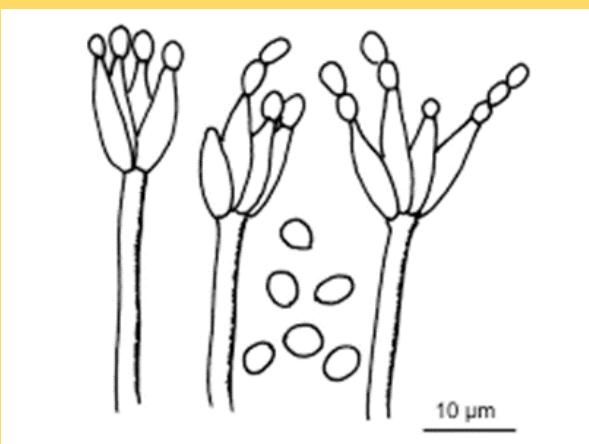
Penicillium citrinum é um anamórfico, espécies de fungos mesófilos do gênero *Penicillium*, que produz ácido tanzawaico AD, ACC, Mevastatina, Quinocitrinina A, Quinocitrinina B e citrinina nefrotóxica.

Penicillium citrinum é frequentemente encontrado em frutas cítricas mofadas e ocasionalmente ocorre em especiarias tropicais e cereais. Esta espécie de *Penicillium* também causa mortalidade pelo mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Devido ao seu caráter mesofílico, *Penicillium citrinum* ocorre em todo o mundo a primeira estatina (Mevastatina) foi isolada de 1970 desta espécie.

Figura 9: Descrição do fungo *Penicillium citrinum*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google.

Penicillium fellutanum

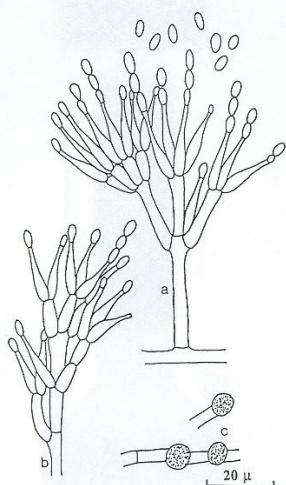


Penicillium fellutanum cresce no solo e em superfícies de sementes e pode tolerar extrema secura e salinidade. *P. fellutanum* é incapaz de solubilizar o fosfato de cálcio, mas solubiliza eficazmente os fosfatos de ferro e alumínio. O genoma de *P. fellutanum* ajudará a desvendar mecanismos de solubilização de P e contribuições fúngicas para o ciclo *P. fellutanum*.

Figura 10: Descrição do fungo *Penicillium fellutanum*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google.

O gênero *Paecilomyces* pode ser distinguido do gênero *Penicillium*, relacionado de perto, com frases e colônias divergentes longas e divergentes que nunca são tipicamente verdes. As espécies de *Paecilomyces* são moldes ambientais comuns e raramente estão associadas à infecção humana. No entanto, as espécies, *P. variotii* e *P. marquandii* estão emergendo como agentes causadores de queratite micótica e de hialohiofomicose no paciente imunocomprometido.

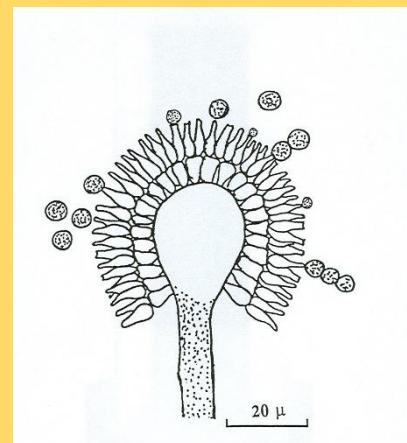
Paecilomyces



Paecilomyces é um gênero de fungos nematófagos que matam nemátodes por patogénese. Por esta razão, estes fungos podem ser usados como bionematicidas por aplicação no solo.

Figura 11: Descrição do gênero *Paecilomyces*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google.

Aspergillus é um gênero de fungos que apresenta coloração branca ou amarelada com formação de pedúnculos e uma ponta colorida. São importantes agentes decompositores de alimentos. São utilizados na produção de alimentos e produção comercial de ácido cítrico, glucônico e gálico. Existem mais de 200 espécies encontradas na natureza.



As espécies de *Aspergillus* são aeróbicas e encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície onde vivem. Contaminam restos de comidas (como pães e batatas) e crescem em muitas plantas e árvores.

Figura 12: Descrição do gênero *Aspergillus*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google.

Tremella é um gênero de fungos na família Tremellaceae. Todas as espécies *Tremella* são parasitas de outros fungos e a maioria produz estados de levedura anamórficos, eles são gelatinosos e são classificados coloquialmente entre os "fungos de gelatina". Existem mais de 100 espécies de *Tremella* são atualmente reconhecidas em todo o mundo e alguns deles são comercialmente cultivados para alimentação.

Tremella sp.



Os corpos de frutas (quando presentes) são gelatinosos. Em algumas espécies, são pequenas (menos de 5 mm de diâmetro) e pustulares para pulverizar (em forma de almofada). Em outros, eles são muito maiores (até 150 mm de diâmetro) e podem ser lobulados variadamente, céfaliformes (como um cérebro, com dobras e cumes), ou foliares (com folhas de folhas ou de algas). Muitas espécies de *Tremella*, no entanto, são parasitas de hymenial, produzindo esporos dentro dos corpos de frutas de seus hospedeiros e são visíveis apenas microscópicamente.

Figura 13: Descrição do gênero *Tremella*, coletado em tegumento de anuros no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife- PE. Fonte da imagem: Google.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há necessidade de conhecer mais a microbiota, que apontam para o conhecimento sobre saúde ambiental e ocupação dos animais no seu habitat. Esse estudo impulsiona outras possibilidades de conhecimentos sobre fungos e sua relação com anfíbios anuros.

Os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* da família Trichocomaceae é conhecida por apresentar resultados de impactos positivos e negativos nas atividades humanas , tais como problemas a vias aéreas (HOUBREAKEN; SAMSON, 2011), todavia ainda não tem sido reportada para anfíbios anuros, não descartando a possibilidade de danos aos mesmos de acordo com o quantitativo desses microrganismos podendo atingir seu sistema imunológico.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ASSIS, A. B. (2015). Microbiota Cutânea e Secreções Dérmicas de *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura) em fragmentos de Floresta Atlântica; Instituto de Biociência de Universidade de São Paulo.
- BRUCKER, R. M. et al. (2008). Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. Journal of Chemical Ecology, v.34, p.1422-1429.
- FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. (1992). Environmental Physiology of the Amphibians. Chicago: The University of Chicago Press, 1992.
- FISHER, M. et al. (2009). Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. Molecular Ecology, v.18, n. 3, p. 415-29, 2009.
- HARRIS, R. N. et al. (2006). Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. EcoHealth, v. 3, n.1, p.53-56.
- HOUBRAKEN, J.; SANSON, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. Studies in Mycology. The Netherlands. V. 70:p. 1-51.
- HYATT, A. D., BOYLE, D. G., OLSEN, V., BERGER, L., OBENDORF, D., DALTON, D., KRIGER, K., HERO. A., HINES, H., PHILLOT, CAMPBELL, R., MARANTELLI, G., GLEASON, F. & COLLING, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms, 73:175-192.
- LAUER, A. et al. (2008). Diversity of cutaneous bacteria whit antifugal activity isolated from female four-toed salamanders. The ISME Journal, v. 2, n. 2, p. 145-57.
- RIKER, A. J. & RIKER, R. S. Isolation, culture, and inoculation. In: . Introduction to research on plant diseases; a guide to principles and practice for studying various plants-disease problems. Madison. University of Wisconsin, 1936. Cap. 5. p 44-58.

ROLLINS-SMITH, L. A. et al. (2002). Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 26, p. 63-72.

SALLE, A. J. (1961). Effect of environment upon bacteria. In: SALLE, A. J. (Ed.). *Fundamental Principles of Bacteriology*. 5. Ed. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company, Inc. P. 232-267.

SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin. *FEBS letters*, v. 416, n. 3, p. 273-275.

TOLEDO, L. F. et al. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology*, v.1, p.185-91, 2006.

WOODHAMS, D. C. et al. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, v.138, n.3-4, p. 390-398.

6. APÊNDICE I: Lista Descritiva de espécies de anfíbios do Parque Estadual Dois Irmãos com imagens das colônias de fungos e imagens de estruturas encontradas de fungos.

Anfíbios (Ordem Anura)

Pristimantis ramagii (Boulenger, 1888)



Nome Vulgar: Desconhecido.

Distribuição Geográfica: Esta espécie é endêmica do Brasil, encontra-se na costa dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe e Bahia.

Habitat/Hábito: Vive em floresta primária e secundária, tanto na borda de matas como áreas rochosas, sendo geralmente encontrada no chão de folhas na serrapilheira, e também na vegetação baixa.

Características: 3 a 5 cm.

Exemplares do *Pristimantes ramagii*

63: Em processo de análise laminar na histologia.

498: *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx)

499: *Paecilomyces* sp.

504: *Aspergillus* sp.

508: *Paecilomyces* sp.

Amostra 508-R1



Amostra 508-R2



510: *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx)

Amostra 510-R1



530: *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx) e Levedura

Amostra 530-R1

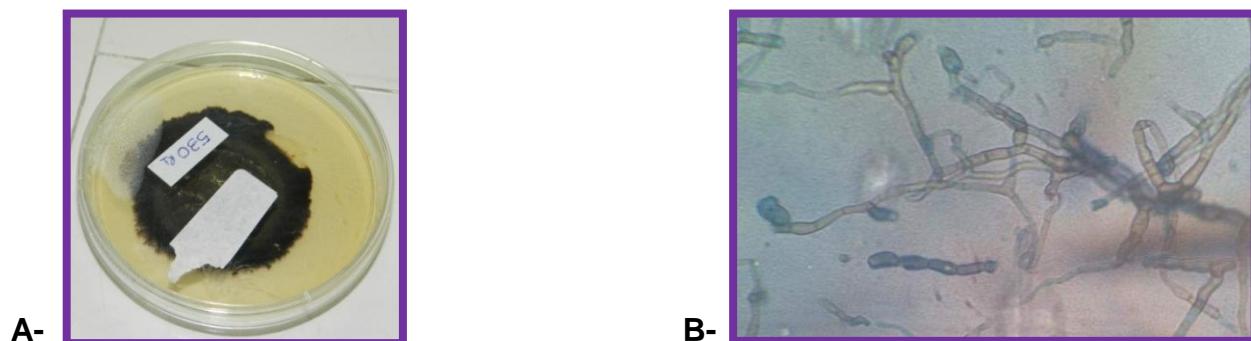


Figura 10: Amostra 508-R1/A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Pristimantis ramagii* (Boulenger, 1888) e B- Estrutura de *Paecilomyces* sp. ; Amostra 508-R2/A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Pristimantis ramagii* (Boulenger, 1888) e B- Estrutura de fungo *Paecilomyces* sp. (fungo encontrado em solo); Amostra 510-R1/A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de

Pristimantis ramagii (Boulenger, 1888) e **B-** Estrutura de fungo *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx) (fungo encontrado em solo) e **Amostra 530-R1/A-** Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Pristimantis ramagii* (Boulenger, 1888) e **B-** Estrutura de fungo *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx) e Levedura.

Hypsiboas albomarginatus (Spix, 1824)



Nome Vulgar: Perereca-Verde ou Perereca-Araponga.

Distribuição Geográfica: Ocorre na Mata Atlântica do leste do Brasil nos estados de Pernambuco a Santa Catarina.

Habitat/Hábito: Vive em arbustos ou no chão, perto dos corpos d'água na borda das florestas tropicais úmidas, em florestas degradadas, e em áreas abertas perto da floresta. Produz em água parada temporária ou permanente, até mesmo em água corrente (THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES).

Características: Coloração verde no corpo e alaranjada no interior da coxa. Médio Porte medindo aproximadamente 68,0 mm.

Exemplares da *Hypsiboas albomarginatus*

71: Em processo de análise laminar na histologia.

Hypsiboas semilineatus (Spix, 1824)



Nome vulgar: Rã-de-Listra

Distribuição Geográfica: É endêmica do Brasil na Mata Atlântica, segundo (FROST, 2011), ocorrendo desde o Estado de Pernambuco até Santa Catarina (SANTOS *et al.*, 2009; FROST, 2011).

Habitat / Hábito: Ocupa diversos microhabitats, sendo registrada frequentemente em áreas florestadas sobre plantas herbáceas e em corpos d'água permanentes (GUEDES; MOURA, 2008).

Características: Apresenta um tamanho corporal mediano com o comprimento rostro-cloacal médio de 55 mm (SANTOS *et al.*, 2009).

Exemplares da *Hypsiboas semilineatus*

52: Em processo de análise laminar na histologia.

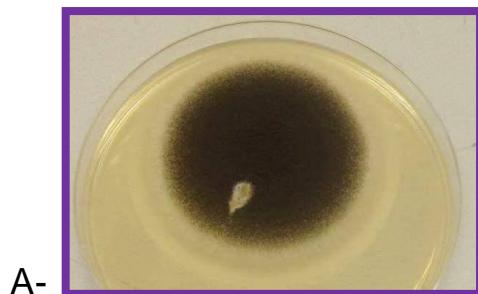
115: Em processo de análise laminar na histologia.

494: *Penicillium aurantiogriseum* (Dierckx)

514: *Tremella sp.*

519: *Aspergillus sp.*

Amostra 519-R1



A-



B-

Figura 11: Amostra 519-R1/A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) e **B-** Estrutura de fungo *Aspergillus sp.* (fungo encontrado em plantas e caules).

Scinax eurydice (Bokermann, 1968)



Nome Vulgar: Desconhecido

Distribuição Geográfica: Mata Atlântica de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia até o norte da cadeia do espinhaço (Chapada Diamantina), em Senhor do Bonfim.

Habitat/Hábito: Vive sempre próximo de lagoas.

Características: Espécie grande do gênero que pode atingir 6 cm de comprimento total.

70: Em processo de análise laminar na histologia.

78: Em processo de análise laminar na histologia.

505: *Penicillium citrinum*

***Leptodactylus troglodytes* (A. Lutz, 1926)**



Nome Vulgar: Caçote.

Distribuição Geográfica: Endêmica do Brasil sendo muito comum na região Nordeste do Brasil nos estados de Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e Minas Gerais.

Habitat/Hábito: Cerrado, Caatinga, e em sistemas de dunas na zona de Mata Atlântica. Ele constrói ninhos de espumas e câmaras de incubação em solo úmido perto de poças temporárias. As larvas se desenvolvem em água.

Características: Cerca de 6 centímetros de comprimento.

Exemplares do *Leptodactylus troglodytes*

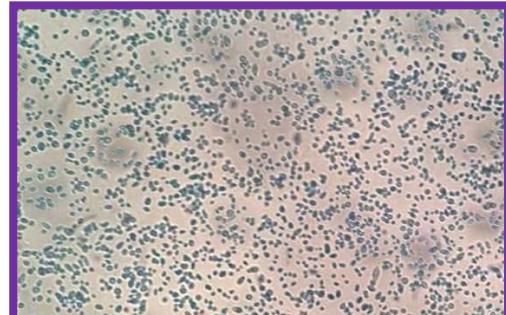
120: Em processo de análise laminar na histologia.

13 B: *Penicillium fellutanum*

Amostra 13B-R2



A-



B-

Figura 12: Amostra 13B-R2/A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Leptodactylus troglodytes* (A. Lutz, 1926) e **B-** Estrutura de *Penicillium fellutanum*.

***Adenomera marmorata* (Lutz, 1930)**



Nome Vulgar: Marmoreado Tropical, rã-touro.

Distribuição Geográfica: É endêmica para o sul do Brasil nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Seus naturais habitats são subtropicais ou tropicais húmidas de baixa altitude florestas, húmidas tropicais ou subtropicais florestas de altitude e jardins rurais.

Habitat/Hábito: É uma espécie diurna que vive no solo na floresta primária e secundária, e também em clareiras e na borda da floresta, bem como em jardins. Os machos normalmente vocalizam sobre o solo sob a vegetação no final da tarde. Os ovos são colocados no chão; girinos viver e desenvolver-se na folha-de maca fora da água. Se alimentam de isópodes, formigas e insetos larvas que são encontrados em abundância em seus habitats.

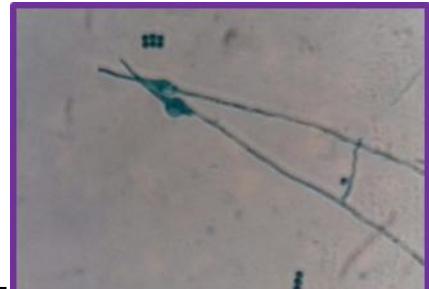
Características: Espécie que tem cerca de 3-5 cm de comprimento, apresentando coloração marmoreada.

(Foto: Google)

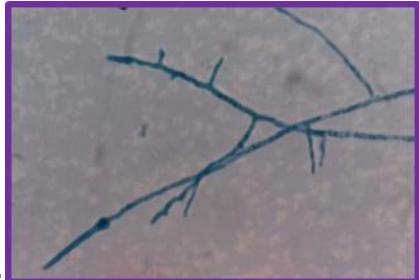
Amostra 526-R1



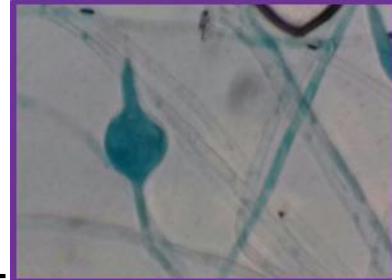
A-



B-



C-



D-

Figura 13: Amostra 526-R1 A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Adenomera marmorata* (Lutz, 1930) e B, C e D- Estruturas de *Paecilomyces sp.*

2Z: *Penicillium fellutanum*.

***Chiasmocleis alagoanus* (Cruz, Caramaschi & Freire, 1999)**



Nome Vulgar: Desconhecido.

Distribuição Geográfica: Conhecida da Mata Atlântica entre Alagoas, Paraíba e Recife.

Habitat/Hábito: Possui hábitos fossoriais, aparecendo sobre o solo nos períodos reprodutivos e chuvoso.

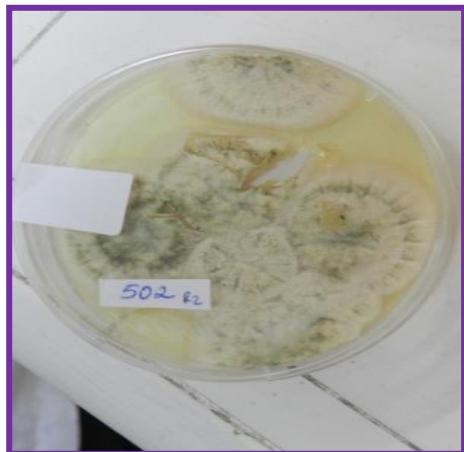
Características: Espécie pequena que atinge cerca de 3 cm de comprimento total.

(Foto: Vanessa Nascimento)

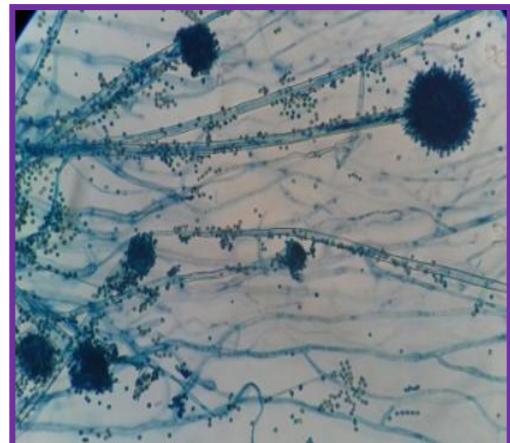
Exemplar de *Chiasmocleis alagoanus*

502: *Penicillium citrinum*.

Amostra 502-R2



A-



B-

Figura 14: Amostra 502-R2/A- Placa de Petri com o crescimento de colônia de fungo filamentoso presente no dorso de *Chiasmocleis alagoanus* (Cruz, Caramaschi & Freire, 1999) e **B-** Estrutura de fungo *Penicillium citrinum*. (fungo encontrado em solo).

Pseudopaludicola falcipes (Hensel, 1867)

Nome Vulgar: Rãzinha

Distribuição Geográfica: Ocorre em todo o Brasil.



Habitat/Hábito: É muito abundante em banhados, charcos, e beira de lagoas, lavouras de arroz e diversos corpos d'água em áreas abertas onde é comum escutar diversos machos em atividade de vocalização, inclusive durante o dia. Van Sluys & Rocha (1998) estudando uma população desta espécie no Estado do Pará, sugeriram que as presas principais sejam hemípteras (percevejos) e dipteross (moscas e mosquitos). Seu canto lembra um estalo repetido seguidamente. Por ter uma distribuição bastante ampla e por ser um anuro muito pequeno é possível que corresponda a um complexo de espécies.

Características: É a uma das menores rãs que mede de 1,5 a 2,0cm. A coloração é marrom clara até cinza, geralmente possui um desenho em forma de Omega no dorso e diversas manchas escuras. Alguns indivíduos apresentam uma faixa clara que vai do focinho até a cloaca, o ventre é branco e nos machos o saco vocal é amarelo.

Exemplar de *Pseudopaludicola falcipes*

511: *Tremella* sp.

Amostra 511-R1



A-



B-

Amostra 511-R2



A-



B-

***Frostius pernambucensis* (Bookerman, 1962)**



Nome Vulgar: Desconhecido

Distribuição Geográfica: Mata Atlântica do Recôncavo Baiano, nas serras do Timbó, em Amargosa, e da Jiboia, em Elíseo Medrado, na Bahia, Alagoas, Pernambuco e Paraíba.

Habitat/Hábito: Vive no folhedo da floresta, bromélias, etc.

Características: Espécie pequena que atinge 3,5 cm de comprimento total.

(Foto: Vanessa Nascimento)

Exemplares de *Frostius pernambucensis*

144: Confirmado através da identificação visual

388: Confirmado através da identificação visual

Girino: Confirmado através da identificação visual

***Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826)**



Nome Vulgar: Rã-cachorro

Distribuição Geográfica: Vive em quase todo o Brasil e ao sul da Floresta Amazônica.

Habitat/Hábito: Vive no folhedo da vegetação, em áreas abertas ou interior de florestas.

Características: Espécie pequena que atinge cerca de 3 cm de comprimento total e apresenta uma vocalização é uma das mais conhecidas e ouvidas, lembrando um latido, ou algo como “foi não foi”.

Exemplares do *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826)

54: Em processo de análise laminar na histologia.

370: Em processo de análise laminar na histologia.

392: Em processo de análise laminar na histologia.

***Dendropsophus branneri* (Cochran, 1948)**



Nome vulgar: Perereca pequena.

Distribuição Geográfica: É endêmica do Brasil nos estados de Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro.

Habitat / Hábito: Vivem em uma grande variedade de habitats, incluindo savanas, matagal, áreas abertas e dunas. Encontra-se em vegetação perto de água estagnada. Produz em poças temporárias e permanentes, são terrestres e de água doce. É uma espécie adaptável a diversos climas e locais.

Características: Mancha branca embaixo dos olhos.

Exemplar do *Dendropsophus branneri*

153: Em processo de análise laminar na histologia.

***Agalychnis granulosa* (Cruz, 1989)**



Nome vulgar: Perereca verde.

Distribuição Geográfica: Encontrada até o momento apenas em Recife/PE, norte de Alagoas e na Serra do Timbó, em Amargosa, na Bahia.

Habitat / Hábito: Vive sobre arbusto e árvores da Mata Atlântica próxima de lagoas temporária.

Características: Perereca de coloração verde, espécie mediana que pode alcançar 6 cm de comprimento total. Encontra-se na lista da IUCN, como espécie criticamente ameaçada.

Exemplar do *Agalychnis granulosa*

702: Em processo de análise laminar na histologia.

Scinax fuscomarginatus (A. Lutz, 1925)



©M.Sacramento

Nome vulgar: Pererequinha-do-brejo.

Distribuição Geográfica: No Brasil sua distribuição foi inicialmente descrita como restrita para as regiões do Cerrado e do Pantanal. No entanto, ele tem posteriormente sido registrado em várias localidades em Mata Atlântica e Caatinga do Nordeste do Brasil (Leite Jr. et al., 2008).

Habitat / Hábito: São comumente encontrados em habitats de pântanos ou nas proximidades de lagos (Haddad, Toledo e Prado, 2008).

Características: Tem um corpo alongado com cerca de 2 para 2,5 cm, apresenta coloração dorsal amarelada, duas bandas mais largas (Bastos et al 2003; Freitas e Silva, 2004; Freitas, 2011) e barriga leve (Bastos et al, 2003).

(Google)

Exemplar da Scinax fuscomarginatus

692: Em processo de análise laminar na histologia.

Dendropsophus minutus (Peters, 1872)



Nome vulgar: Perereca pequena.

Distribuição Geográfica: Mata Atlântica do Sul do Brasil até o Rio Grande do Norte, parte do bioma cerrado e também em Pernambuco foi encontrado no PEDI.

Habitat / Hábito: Vive sobre a vegetação aquática em lagoas da Mata Atlântica.

Características: Espécie pequena que alcança 2 cm de comprimento total.

(Google)

Exemplar da Dendropsophus minutus

694: Em processo de análise laminar na histologia.

Phyllodytes luteolus (Wied-Neuwied, 1824)



Nome vulgar: Perereca dourada

Distribuição Geográfica: Conhecida na Mata Atlântica do Rio de Janeiro até Pernambuco.

Habitat / Hábito: Vive unicamente dentro de bromélias, notadamente em restingas, apresenta fase larval livre (PEIXOTO, 1977).

Características: Espécie pequena que pode alcançar 3 cm de comprimento total.

(Google)

Exemplares da *Phyllodytes luteolus*

24: Em processo de análise laminar na histologia.

122: Em processo de análise laminar na histologia.

Scinax auratus (Wied-Neuwied, 1821)



Nome vulgar: Perereca.

Distribuição Geográfica: Ocorre na mata Atlântica do nordeste do Brasil.

Habitat / Hábito: Pode ser encontrada no interior da floresta em afloramentos rochosos e em áreas abertas ao longo da borda da floresta (ALVES et al, 2004; REVISTA BRASILEIRA DE ZOOLOGIA). É uma espécie muito adaptável e é encontrada também no interior de bromélias epífitas (BOKERMANN, 1969). Produz em poças temporárias e permanentes, espécie terrestre e de água doce (THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES).

Característica: Diagnosticada pelo padrão dorsal de listas brancas dorsolaterais em fundo castanho-escuro, interocular faixa transversal branca e pequenas manchas brancas espalhadas; focinho arredondado e vista dorsal e perfil; dorsal pele lisa (BIO

Exemplar da *Scinax auratus*

72: Em processo de análise laminar na histologia.

***Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821)**



Nome vulgar: Sapo-de-Mata, Sapo-Cururu.

Distribuição Geográfica: Esta espécie ocorre na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai.

Habitat / Hábito: Florestas subtropicais ou tropicais úmidas e serapilheira de baixa altitude, próximo a rios intermitentes de água doce e brejos. São mais noturnos, refugiam-se entre raízes, lajes de pedra ou sob folhiço (IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES).

Características: Podem chegar a 9-12 cm.

Exemplares de *Rhinella crucifer*

75: Em processo de análise laminar na histologia.

137: Em processo de análise laminar na histologia.

APÊNDICE II: Módulo RAPELD

As parcelas trabalhadas apresentam comprimento de 250 m com 1 m de largura, essa parcela é demarcada no campo apenas pelo corredor central, sendo este com 1 m de largura e estende-se por todo o comprimento da parcela. Para viabilizar a integração e existência de pesquisas de longo prazo, as parcelas terrestres foram divididas em três zonas ou faixas (**Figura 1**). Cada uma destas faixas contempla uma das três principais formas de coleta de dados: amostragem de organismos sensíveis, amostragem de impacto, amostragem destrutiva/ manipulativa.

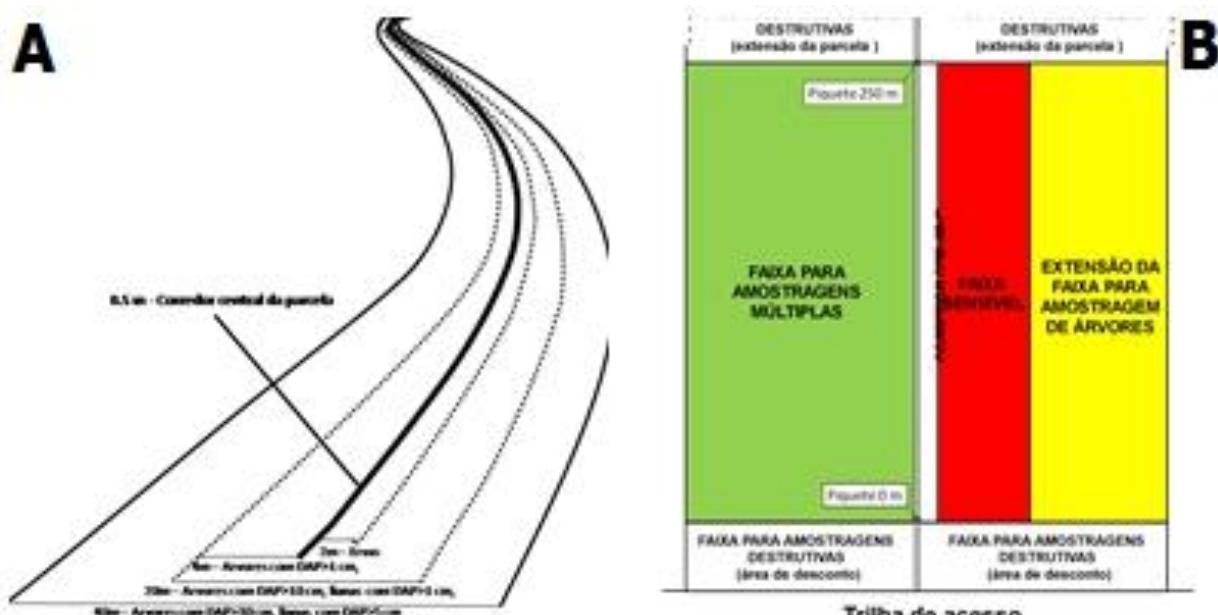


Figura 1: A- Esquema da parcela terrestre seguindo a curva de nível. A parcela é delimitada apenas pelo corredor central e a parcela apresenta 1 m de corredor; B- Diagrama ilustrando o zoneamento das parcelas terrestres e localização das faixas definidas para cada modalidade de pesquisa.

