



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA, USO E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

MIRIAN DOS SANTOS MENDES

DETECÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* EM ANUROS NO ESTADO
DO CEARÁ, BRASIL

FORTALEZA
2021

MIRIAN DOS SANTOS MENDES

DETECÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* EM ANUROS NO ESTADO DO
CEARÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cascon.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M492d Mendes, Mirian dos Santos.
Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros no estado do Ceará, Brasil / Mirian dos Santos Mendes. – 2021.
58 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profª. Dra. Denise Cavalcante Hissa.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Cascon.
1. Quitridiomicose. 2. Caatinga. 3. Semiárido. 4. Anfíbios. 5. Patógeno. I. Título.

CDD 578.7

MIRIAN DOS SANTOS MENDES

DETECÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* EM ANUROS DO ESTADO NO
CEARÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade. Área de concentração: Conservação.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Laís Feitosa Machado
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Dra. Joice Ruggeri Gomes
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Este trabalho é dedicado à minha família, pelo incentivo, apoio, ensinamentos e amor a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por nunca me abandonar e permitir que a graça dele estender-se até mim. Em seguida, agradeço a minha família por me apoiar incondicionalmente. À minha mãe **Ivonete** e meu pai **Nonato**, por sonhar para mim planos mais ambiciosos que os meus, nunca duvidando do meu potencial e segurar minha mão durante todo o caminho. À minha irmã **Keila** por ser uma amiga tão fiel. As minhas amigas **Ruthe** e **Raquel**, que mesmo distante sempre tiveram o cuidado de saber como eu estava e por sempre me darem tanta força. E a cada um dos meus familiares por serem uma parte de quem eu sou, eu amo demais vocês.

À **Kelvin Jhonson**, pelos conselhos, força e por ser uma das pessoas que mais admiro e se tornou minha inspiração. Obrigada por acreditar em mim até em momentos que eu mesma não acreditei, fazer mestrado era meu sonho e você foi uma das pessoas que mais me apoiou. Serei sempre grata, meu amor.

Ao **Prof. Dr. Anderson Guzzi**, por ser tão prestativo, por sempre se mostrar disposto a ajudar quando eu tinha alguma dúvida. Me mandou o edital do PPG-Sis e se mostrou a disposição para me ajudar. Muito obrigada.

À **Profa. Dra. Maria Izabel Gallão**, por me receber tão bem no programa, pelo carinho, atenção e por ter sido tão perseverante e ajudado com minha bolsa. A senhora foi crucial nessa jornada.

À **Ana Fernandes e família** que me receberam de braços abertos em sua casa assim que me desloquei para Fortaleza, vocês são minha família, obrigada pela confiança e cuidados. Não tenho palavras para agradecer.

Um imenso obrigada à **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa**, que além de ser um ser humano extremamente gentil é uma orientadora maravilhosa. Muito obrigada pelas palavras sinceras, pelos cuidados que vão até além do laboratório, pelas palavras de conforto e apoio, por sempre escutar o que eu tenho a dizer e incentivar a minha curiosidade científica, e pela paciência. Pela ajuda financeira e esforços nos trabalhos laboratoriais e campo. É uma honra ser orientada pela senhora.

Queria agradecer ao meu coorientador **Prof. Dr. Paulo Cascon**, pela imensa ajuda nas correções, sempre com ensinamentos válidos, pela inspiração em trabalhos de campo e grande ajuda.

Agradeço também à **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**, por sempre dar ensinamentos valiosos, pelo incentivo nos experimentos e me inspirar pela sua paixão pela ciência.

Ao **Prof. Dr. Vicente Faria**, por ser um professor atencioso e solícito a responder qualquer dúvida e pela imensa ajuda com minha orientadora, pelas perguntas certas e por ter sido o mediador, não sei como teria sido sem o senhor. Agradeço também pelas aulas leves, mas cheias de ensinamentos e descobertas. E por fim, por aceitar participar da banca examinadora da minha qualificação e na defesa como suplente, o senhor é um exemplo.

À **Luzia Gabrielle Zeferino (Zulia)**, que dividiu comigo sonhos, medos e pelas incontáveis vezes que estive presente comigo em laboratório. No momento que escrevo esse texto lágrimas correm dos meus olhos, não sei o que seria de mim sem você. Você é para mim uma inspiração, obrigada por me permitir crescer do seu lado, pela paciência, por sempre ter uma palavra amiga e pelas gargalhadas que compartilhamos (porque nem tudo é luta rs).

À **Dra. Andréa Oliveira**, por ter me acolhido no laboratório, pela paciência em me ensinar, aprendi tanto que nem consigo imaginar, pelas palavras amigas, por ser uma pessoa positiva até nos momentos difíceis (quando os experimentos davam errado, nem se fala rs), pelos abraços, por todas as ajudas, pelos sorrisos e pelo clima leve que sempre transmite pela sua simples presença, você é um exemplo de mulher e cientista para mim.

Andréa e Luzia, a minha eterna gratidão pelas pessoas extraordinárias que vocês são, por segurarem na minha mão, por mostrarem segurança para meus desabafos, muitas vezes foram as pessoas que me senti segura para conversar, principalmente por estar longe da família, vocês se tornaram minha família no laboratório. Pelo trabalho em equipe, pelas horas do tempo de vocês. Eu amo vocês. Muito obrigada.

À **Sra. Lúcia Castro Cunha** pela hospitalidade e autorização para realizar coletas na RPPN Monte Alegre.

Não sei nem como agradecer à **Luan Rebouças, Felipe Augusto Correia Monteiro, Cícero Ricardo de Oliveira, Wilmara Mascarenhas Martins, Dalila Batista de Oliveira** pela grande ajuda nas coletas na Chapada do Araripe e Farias Brito, à **Thabata Cavalcante dos Santos** por fotografar e ajudar nas coletas no Planalto da Ibiapaba, à **Carol** e equipe do **Nurof** pela oportunidade de coletar em Ubajara, além da mão de obra, vocês me ensinaram sobre identificação de algumas espécies em campo. Obrigada por doar tantas horas do tempo de vocês, por confiar em mim e por encarar como um trabalho em equipe. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila** por aceitar participar da minha banca, pela confiança e ter me recebido no Crato, ajuda nas coletas de Campos Sales, Chapada do Araripe, Farias Brito e Ubajara. Mesmo não me conhecendo foi super solícito e não mediu esforços para me ajudar. Muito Obrigada.

À **Profa. Dra. Joice Ruggeri Gomes** e **Profa. Dra. Laís Feitosa Machado**, pela confiança e aceitar e participar da minha banca, ao **Dr. Igor Joventino Roberto** pela suplência. Para mim é uma imensa honra.

Ao secretário do programa de pós, **Jessé Teixeira Hurbano**, que muitas vezes não mediu esforços para me ajudar, obrigada pela paciência e por ser sempre prestativo. Muito obrigada!

O meu muito obrigada a todos que fazem parte do **LARGEN** e **LEMBIOTECH**, vocês são uma família para mim e eu não sei dizer o quão sou grata por vocês me aceitarem como uma de vocês. Em especial, **Saulo Gonçalves**, que me ajudou com o *Bd*. Por fim, queria agradecer a coordenação do PPG em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade e a todos os professores que ajudaram nessa jornada. Também deixo aqui a minha gratidão ao órgão de fomento **Funcap**, que contribuiu para a minha formação.

Uso a palavra para compor meus silêncios. Não gosto das palavras fatigadas de informar. Dou mais respeito às que vivem de barriga no chão tipo água pedra sapo. Entendo bem o sotaque das águas. Dou respeito às coisas desimportantes e aos seres desimportantes. Prezo insetos mais que aviões. Velocidade do preço das tartarugas mais que a dos mísseis. Tenho em mim esse atraso de nascença. Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos. Tenho abundância de ser feliz por isso. Meu quintal é maior do que o mundo. Sou um apanhador de desperdícios: Amo os restos como as boas moscas. Queria que a minha voz tivesse um formato de canto. Porque eu não sou da informática: eu sou da invencionática. Só uso a palavra para compor meus silêncios.

O apanhador de desperdícios (Manoel de Barros)

RESUMO

Os anfíbios apresentam as maiores taxas de extinção de espécies, quando comparados com qualquer outro grupo de vertebrados. A quitridiomiose, doença provocada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) que tem globalmente afetado os anfíbios desde a década de 70, tem sido considerada a principal causa desse declínio. Levando-se em consideração que o Brasil é o país com maior riqueza de anfíbios, com muitas espécies endêmicas, torna-se necessário compreender os efeitos da quitridiomiose em território brasileiro. Somando a isso, poucos são os estudos na região semiárida do país. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar se populações de anuros residentes no estado do Ceará apresentam resultado positivo para fungo *Bd*. O trabalho foi realizado por meio de coletas nas seguintes áreas: Reserva Particular do Patrimônio Nacional (RPPN) Monte Alegre em Pacatuba, Planalto da Ibiapaba, Serra de Maranguape, Chapada do Araripe, Farias Brito e Campos Sales. A coleta de amostras da pele de anfíbios foi realizada utilizando *swab* após captura dos anuros adultos. Em seguida, realizou-se a extração do DNA total dos *swabs* através do Kit PrepMan e as amostras foram submetidas à técnica de PCR utilizando-se iniciadores específicos para o *Bd* (*Bd1a* 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3' e o *Bd2a* 5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'). Foram analisadas 125 amostras, compreendendo 28 espécies pertencentes a 8 famílias de anuros, com 20 (69 %) destas espécies apresentando resultado positivo para presença do fungo *Bd*. Todas as localidades apresentaram resultados positivos, sendo Farias Brito o local com maior proporção de espécies positivas (88 %) e Maranguape o local com menor proporção de espécies positivas (7 %). O presente estudo resultou no primeiro registro de infecção pelo *Bd* para as espécies *Boana raniceps*, *Dendropsophus nanus*, *Dendropsophus soaresi*, *Scinax x-signatus*, *Leptodactylus troglodytes*, *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cicada*, *Pseudopaludicola mystacalis*, *Proceratophrys ararype* e *Adenomera juikitam*. De forma preocupante, entre as espécies que apresentaram resultado positivo, encontram-se *Pristimantis* sp. e *Proceratophrys ararype* que apresentam distribuição restrita aos brejos de altitude, refúgios florestais que se encontram sob forte ameaça de ações antrópicas. Portanto, os resultados do presente estudo confirmam a presença do fungo *Bd* em 20 espécies de anuros e em 6 locais do estado do Ceará, tanto em áreas de Caatinga como em áreas de brejos de altitude e fornecem os primeiros dados para subsidiar medidas de prevenção contra o fungo *Bd* no estado do Ceará.

Palavras-chave: quitridiomiose; caatinga; semiárido; anfíbios; patógeno.

ABSTRACT

Amphibians have the highest species extinction rates when compared to any other vertebrate group. Chytridiomycosis, a disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) that has globally affected amphibians since the 1970s, has been considered the main cause of this decline. Taking into account that Brazil is the country with the greatest wealth of amphibians, with many endemic species, it is necessary to understand the effects of chytridiomycosis in Brazilian territory. Adding to this, there are few studies in the semi-arid region of the country. Thus, this study aimed to investigate whether anuran populations residing in the state of Ceará present positive results for the *Bd* fungus. Pacatuba, Ibiapaba Plateau, Serra de Maranguape, Chapada do Araripe, Farias Brito and Campos Sales. The collection of samples from the skin of amphibians was performed using a swab after capturing the adult frogs. Then, total DNA extraction from the swabs was performed using the PrepMan Kit and the samples were submitted to the PCR technique using specific primers for *Bd* (*Bd1a* 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3' and *Bd2a* 5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG -3'). 125 samples were analyzed, comprising 28 species belonging to 8 anuran families, with 20 (69%) of these species showing positive results for the presence of the *Bd* fungus. (88%) and Maranguape the place with the lowest proportion of positive species (7%). The present study resulted in the first record of *Bd* infection for the species *Boana raniceps*, *Dendropsophus nanus*, *Dendropsophus soaresi*, *Scinax x-signatus*, *Leptodactylus troglodytes*, *Leptodactylus vastus*, *Physalaemus cicada*, *Pseudopaludicola mystacaliskera*, *Proceratophrys julysmera* and *Adenophrys*. Worryingly, among the species that showed positive results, there are *Pristimantis* sp. and *Proceratophrys ararype*, which have a restricted distribution to high-altitude swamps, forest refuges that are under strong threat from anthropic actions. Therefore, the results of the present study confirm the presence of the *Bd* fungus in 20 species of anurans and in 6 locations in the state of Ceará, both in Caatinga and swamp areas, and provide the first data to support preventive measures against the *Bd* fungus in the state of Ceará.

Keywords: chytridiomycosis; caatinga; semi-arid; amphibians; pathogen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – *Bokermannohyla capra* (A) e *Leptodactylus* cf. *macrosternum* (B) com sinais macroscópicos sugestivos de quitridiomicose, como a perda de pigmentação da pele (marcas brancas indicadas pelas setas vermelhas). (Fonte: (AMORIM et al., 2019) 16
- Figura 2 – Mapa com os locais onde foi registrada a incidência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* nos biomas brasileiros. Dados obtidos de Carvalho et al. (2017) e Tabela 1..... 24
- Figura 3 – Mapa do estado do Ceará, Brasil, com os pontos onde foram realizadas as coletas do presente estudo..... 25
- Figura 4 – Coleta de material biológico com *swab* realizado na RPPN Monte Alegre em Pacatuba, Ce (*Scinax x-signatus*). Foto: Saulo G. S. Bezerra..... 26
- Figura 5 – Mapa do estado do Ceará, Brasil, com os pontos onde foram realizadas as coletas do presente estudo. O diâmetro do círculo é proporcional à porcentagem de espécies que foram detectadas com *Bd* para cada local. Número de espécies amostradas/número e porcentagem de espécies com resultado positivo 1- Campos Sales 11/7 (63,64%). 2- Farias Brito 8/7 (87,5%). 3- Chapada do Araripe 9/6 (66,6%). 4- Planalto da Ibiapaba 14/6 (42,96%). 5- Maranguape 14/1(7,14%). 6- RPPN Monte Alegre 13/5 (38,46%) 30
- Figura 6 – Gel de Eletroforese agarose 2% com amplificação por PCR (300pb) 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Áreas no Brasil com registros de anfíbios infectados com Bd. Mata Atlântica (MA); Floresta Amazônica (FA); Cerrado (CE); Caatinga (CA); Pantanal (PAN).....	20
Tabela 2	– Concentrações finais utilizadas na reação de PCR para 35 µL.....	27
Tabela 3	– Espécies de anuros distribuídas nas suas respectivas famílias taxonômicas e locais de amostragem. (0) representa que a espécie não foi coletada no local, (+) representa que a espécie apresentou resultado positivo para <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no local, e (-) representa que a espécie apresentou resultado negativo para o <i>Bd</i>	31
Tabela 4	– Espécies que apresentaram indivíduos positivos para <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no presente trabalho, junto com suas áreas de distribuição, Bioma/Vegetação de ocorrência e status de conservação de acordo com IUCN (2021), Fonte: Frost (2021)	33
Tabela 5	– Espécie mais relacionada no GenBank com as sequências consensus referentes ao RNAr 5.8S obtidas das amostras CS11, CS13, FB02, PA27, PU01 E CA18. Legenda: CS = Campos Sales, FB = Farias Brito, PA = RPPN Monte Alegre, PI = Planalto da Ibiapaba, CA = Chapada do Araripe.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Cenário mundial da Quitridiomicrose	14
2.2	Dispersão do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	16
2.3	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> no Brasil	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Coleta de dados	24
3.2	Amostragem	25
3.3	Extração do material genético	26
3.4	PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	26
3.5	Purificação e precipitação do DNA amplificado	28
3.6	Sequenciamento dos produtos de PCR	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Coleta	34
4.2	Deteção do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por PCR	36
4.3	Identificação Molecular	36
5	DISCUSSÃO	36
5.1	Análise geral do estudo	36
5.2	Localidades do estudo	38
5.3	Espécies com resultado positivo para o patógeno no estudo	39
5.4	Espécies com resultado negativo para o patógeno no estudo	44
5.5	Técnicas para deteção do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	46
5.6	Formas de mitigação do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	46
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma vasta diversidade de animais e plantas, sendo o país com maior riqueza de espécies de anfíbios do planeta (SEGALLA et al., 2019). No entanto, a biodiversidade global vem sendo constantemente ameaçada por ações antrópicas, existindo uma grande preocupação entre biólogos e profissionais de saúde em relação à conscientização da sociedade sobre a importância da sua conservação da natureza. A redução da biodiversidade tem como consequências, entre outras, alterações na propagação de doenças que afetam os humanos, diminuição de bens da natureza que seriam utilizados para produção de medicamentos, redução na produção de alimentos, alterações na qualidade da água e impacto em todos os demais produtos e serviços ecológicos prestados pelos ecossistemas (COSTANZA et al., 1997; BAILEY, 1999; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os sapos, rãs e pererecas compõem a ordem biológica Anura, que está incluída na classe Amphibia (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Os anuros frequentemente alcançam elevadas densidades populacionais, desempenhando papel fundamental nas cadeias alimentares de muitos ecossistemas terrestres (HOCKING ; BABBITT, 2014). Os anuros também se destacam no controle de pragas, como bioindicadores de qualidade ambiental e fonte de fármacos (OZA, 1990; RAGHAVENDRA; SHARMA; DASH, 2008; ROSSA-FERES et al., 2011).

Apesar de sua importância para os ambientes, a conservação dos anfíbios é motivo de preocupações, tendo sido registrados declínios em 501 espécies no mundo, compreendendo 6,5% das espécies descritas de anfíbios, incluindo 90 extinções (18%) (SCHEELE et al., 2019), sendo o grupo dos vertebrados com maiores taxas de extinção (STUART et al., 2004; CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017). Dentre as causas desses declínios, estão perda de habitat, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e poluição (COLLINS; STORFER, 2003). Entretanto, a maior causa para essas altas taxas de declínio é a contaminação pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) Longcore; Pessier; Nichols (1999) causador da quitridiomiose. Esse fungo tem se espalhado por vários continentes e causado a morte de uma enorme quantidade de anfíbios (FISHER; GARNER, 2020).

No Brasil, poucos estudos investigaram o número de espécies de anfíbios infectadas e a distribuição geográfica das mesmas (RODRIGUEZ et al., 2014; WOODHAMS et al., 2015; CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017). Nesse contexto, fazem-se necessários estudos que abranjam regiões ainda não investigadas, além do monitoramento de áreas onde o fungo já foi registrado. Estudos que avaliem as infecções de anfíbios por esse fungo são extremamente

urgentes, pois poderão subsidiar medidas voltadas para a conservação global desses organismos. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar se populações de anuros residentes no estado do Ceará apresentam resultado positivo para fungo *Bd*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cenário mundial da Quitridiomicose

A quitridiomicose é uma doença altamente contagiosa que tem causado declínio de populações de anfíbios em todo o mundo. Ela é vista como o principal agente de extinção do grupo em escala global (BURROWES; DE LA RIVA, 2017; SCHEELE et al., 2019).

A doença quitridiomicose é causada por duas espécies de fungos pertencentes ao filo Chytridiomycota. A espécie *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) descrita por Longore et al. (1999), e a espécie *B. salamandrivorans* (*Bsal*) descrita por Martel et al. (2013).

O filo Chytridiomycota é composto por fungos heterotróficos que têm distribuição cosmopolita (PESSIER et al., 1999). Os Chytridiomycota possuem características de organismos de áreas aquáticas e ribeirinhas por serem os únicos que tem zoósporo móvel com flagelo (esporo móvel) (JAMES et al., 2009). A maioria das espécies de fungos quitrídeos foi catalogada como organismos aquáticos ou do solo, podendo ser aeróbicos ou anaeróbicos e de vida livre ou parasitas obrigatórios de fungos, algas, plantas ou invertebrados, como insetos, rotíferos e nematóides (BERGER, 1998; FISHER et al., 2009).

O *Bd* e o *Bsal*, junto com o parasita de peixes *Ichthyochytrium vulgare*, são os únicos Chytridiomycota que parasitam animais vertebrados, bem como os únicos a infectar células queratinizadas que estão na epiderme de anfíbios vivos (PESSIER et al., 1999). O epíteto específico do *Bd* é uma referência aos anuros da espécie *Dendrobates azureus* que foram encontrados mortos no Smithsonian National Zoological Park localizado em Washington, Estados Unidos, onde o patógeno foi isolado pela primeira vez no ano de 1998. O nome genérico, por sua vez, é relativo a *Batracho* (do grego = rã) e *chytrium* em referência ao filo Chytridiomycota (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Finalmente, o epíteto específico de *B. salamandrivorans* significa “comedor de salamandras”, devido ao patógeno infectar a pele de salamandras e ter sido isolado pela primeira vez nesses animais (MARTEL et al., 2013).

Estudos realizados em sequências do genoma do *Bd* revelaram que há, pelo menos

5 linhagens desse fungo: uma linhagem panzoótica, chamada de *Bd*-GPL; a linhagem da Suíça, *Bd*-CH; a linhagem do Cabo, *Bd*-Cape, as linhagens *Bd* ASIA-1 (com relação ancestral com outras linhagens), *Bd* ASIA-3, também da Ásia, e a linhagem *Bd*-Brasil (FISHER; GARNER, 2020). A linhagem *Bd*-Brasil foi uma das primeiras que divergiu das demais linhagens na história filogenética (ROSENBLUM et al., 2013). Fisher e Garner (2020) relatam que há linhagens variantes do *Bd*, dentre elas se encontra a variante *Bd* ASIA-2/BRASIL no Brasil, encontrada no bioma Mata Atlântica, na Coreia, e trazem evidências de reprodução sexual em *Bd* (SCHLOEGEL et al., 2012).

O declínio e a extinção de espécies de anfíbios têm sido relatadas desde a década de 1970 (ETEROVICK et al., 2005; ALMEIDA-GOMES et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2014). Entretanto, foi apenas na década de 1990 que estes fenômenos, que estavam ocorrendo em todo o mundo, passaram a não ser associados apenas às mudanças ambientais (ALTWEGG; REYER, 2003). Nos anos de 1996 a 1998, foi registrada a morte de anfíbios por uma enfermidade observada em sua pele, que, posteriormente, foi associada à presença de organismos do grupo dos quitridiomycetos (BERGER; SPEARE; HYATT, 1999). A infecção apresentava formas arredondadas que estavam na epiderme dos anuros. Com o auxílio da microscopia eletrônica foi possível ver a pele com mais detalhes, sendo relatada a presença de organismos intracelulares com zoósporos que são característicos de membros do grupo Chytridiomycota (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).

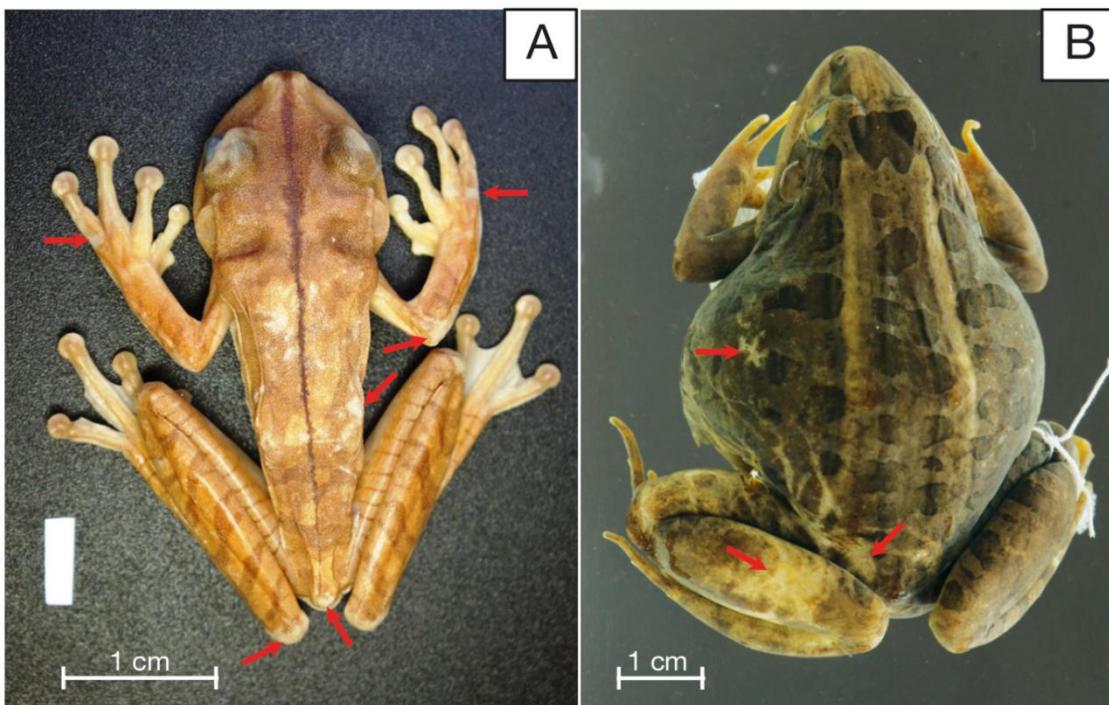
A primeira descrição do fungo *Bd* foi feita em anuros jovens e adultos vivos infectados com a doença, assim como em exemplares mortos, encontrados no alto de montanhas em florestas tropicais localizadas em Queensland na Austrália e no Panamá (JAMES et al., 2009). Naquela época, havia vários aparecimentos de indivíduos mortos e uma quantidade considerável de declínios de populações, se tornando uma preocupação global (BERGER et al., 1998).

O número de locais onde foram informadas as ocorrências de animais infectados progrediu ao longo dos anos, sendo também detectada a presença do *Bd* em girinos, após a onda de desaparecimento de adultos com a enfermidade (BERGER et al., 1998). A partir destas constatações, os indivíduos mortos foram analisados sendo confirmada a presença do fungo em zonas cutâneas como causador desses declínios de anfíbios (BERGER et al., 1998).

A enfermidade encontrada na pele de anfíbios ataca a epiderme do indivíduo (Figura 1), causando uma condição chamada de hiperqueratose, que é o engrossamento da camada externa da pele onde está presente a queratina. A queratina está presente em grande parte da camada externa da pele de anfíbios, e tem como função a proteção do corpo contra a infiltração

de água e de agentes químicos e biológicos presentes no meio ambiente. A hiperqueratose causada pelo *Bd* em anfíbios provoca um desequilíbrio osmótico e distúrbios eletrolíticos, resultando em dificuldades na respiração, parada cardíaca e, conseqüentemente, morte do animal (BERGER, 1998; VOYLES et al., 2009). A quitridiomiose se espalha de forma rápida e avassaladora no corpo do indivíduo (FISHER et al., 2009).

Figura 1– *Bokermannohyla capra* (A) e *Leptodactylus* cf. *macrosternum* (B) com sinais macroscópicos sugestivos de quitridiomiose, como a perda de pigmentação da pele (marcas brancas indicadas pelas setas vermelhas).



Fonte: (AMORIM et al., 2019).

2.2 Dispersão do *Batrachochytrium dendrobatidis*

Os fatores que provocam a dispersão e o aumento da patogenicidade do fungo têm sido motivo de debate (SCHEELE et al, 2019). Há hipóteses que postulam que a intensificação de surtos causados pelo fungo *Bd* está ligada a modificações no ambiente, como mudanças climáticas (RACHOWICZ et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2014). O *Bd* esteve presente na África, Ásia e América do Norte anos antes de declínios de populações de anfíbios serem registradas no mundo (GOKA et al., 2009; VREDENBURG et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2014). Há evidências que o aumento da virulência do *Bd* pode ter sido provocado por alterações climáticas nesses locais que apresentavam o fungo (POUNDS et al., 2006).

Para compreendermos como a infecção pelo patógeno tem se espalhado no globo

devemos analisar também sua prevalência e potenciais dispersores (LIPS et al. 2006; CHENG et al., 2011). Alguns estudos destacam portadores que possivelmente dispersam a quitridiomiose, mas não se infectam, como répteis (PONTES, et al., 2018), anfíbios (KOLBY et al., 2015), aves aquáticas (JOHNSON; SPEARE, 2003; JAMES et al., 2006; LIPS et al., 2006; BURROWES; DE LA RIVA, 2017) e crustáceos (MCMAHON et al., 2013), devendo ser considerada, também, a dispersão através do vento e da chuva (KOLBY et al., 2015).

Em um estudo realizado na Bélgica, foi detectada a presença do *Bd* em 15% das amostras coletadas em gansos e patos selvagens (GARMYN et al., 2012). Análises laboratoriais *in vitro* em amostras coletadas dos pés das aves, onde há presença de queratina na pele, registraram esporângios que liberavam zoósporos móveis, característica do *Bd*, sugerindo que o mesmo possa ser repassado de forma bem sucedida por meio de aves aquáticas ao voarem de um local para outro, dispersando zoósporos em habitats aquáticos (GARMYN et al., 2012).

Há duas hipóteses bastante persistentes que tentam explicar a dispersão do *Bd*, levando a disseminação desse patógeno à níveis globais (LIPS, 1999). A primeira supõe que a infecção começou na África, e em seguida foi transmitida para outros continentes pelo comércio de *Xenopus laevis* para pesquisas científicas, farmacológicas e aquários (WELDON et al., 2004). A segunda supõe que a disseminação foi devido ao transporte intercontinental da rã *Lithobates catesbeiana* (rã-touro) que é muito utilizada na culinária de diversos países (JAMES et al., 2009).

2.3 *Batrachochytrium dendrobatidis* no Brasil

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta (MITTERMEIER et al., 2011), distribuída em seis biomas com características distintas que abrigam uma variedade de espécies, combinando diversidade e endemismo, essa grande riqueza de espécies está constantemente ameaçada pelas ações humanas. Os biomas Mata Atlântica e Cerrado já constam da lista mundial de *hotspots* (MYERS et al., 2000), sendo considerados regiões prioritárias para conservação, por apresentarem alta biodiversidade e grande risco de degradação (MYERS, 1988).

O Brasil exibe a maior riqueza de anfíbios do mundo, com 1.214 (14,60%) das 8.314 espécies de anfíbios presentes em todo o mundo (SEGALLA et al. 2019; FROST, 2021). Esses animais constituem um dos grupos de organismos mais ameaçados pela atual crise de biodiversidade, com 40% das espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2021).

A quitridiomiose se espalhou pelo Brasil, com um maior número de populações

infectadas detectadas na Mata Atlântica (CARVALHO; BECKER; TOLEDO, 2017), devido, pelo menos em parte, a maior concentração de estudos na região. No entanto, o número de sítios *Bd* registrados no Brasil vem crescendo e acentuando as preocupações quanto à contenção da doença (AMORIM et al., 2019; BENÍCIO et al., 2019). Além de afetar a diversidade dos anuros, o problema se estende a outras espécies, pois os anfíbios representam um importante componente da cadeia alimentar. O declínio de suas populações pode afetar o controle de pragas e causar o declínio das populações de predadores de anfíbios, como as cobras (SHUMAN-GOODIER et al., 2019; ZIPKIN et al., 2020), afetando a biodiversidade brasileira como um todo.

Em relação aos fatores ambientais relacionados à dinâmica da doença na Mata Atlântica, Gründler et al. (2012) investigaram os efeitos da altitude e habitat de reprodução na prevalência e infecção individual (carga de zoósporos/indivíduo). A prevalência de *Bd* aumentou de forma significativa e constante com a altitude, ocorrendo também uma interação entre altitude e local de reprodução, com uma maior probabilidade de infecção em anuros reproduzindo em habitats lóticos localizados em baixas altitudes. Os mesmos autores (GRÜNDLER et al., 2012) relataram infecções individuais maiores em altitudes mais elevadas e em ambientes lênticos e terrestres, em comparação com ambientes lóticos, mas não encontraram evidências de interação entre altitude e habitat de reprodução. Ruggeri et al. (2018) por sua vez, analisaram a influência da sazonalidade das chuvas e da disponibilidade de água sobre a prevalência e intensidade de *Bd* na Mata Atlântica. Seus resultados indicaram maiores prevalências em áreas com maior disponibilidade de água e durante a estação chuvosa/quente. Por outro lado, os mesmos autores (RUGGERI et al., 2018) registraram uma severidade da infecção menor na estação chuvosa/fria, em comparação com a estação seca/quente. Ruggeri et al. (2018) consideram que o aumento da prevalência na estação chuvosa pode ser resultado da aglutinação dos anuros nos corpos d'água para reprodução neste período e a maior intensidade na infecção durante a estação seca poderia ser explicada por um aumento na suscetibilidade ao *Bd* neste período.

A Tabela 1 apresenta os locais com registro do fungo *Bd* no Brasil. Sua incidência é observada em populações de clima subtropical, como no Sul, compreendendo Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR); climas tropicais nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, formados por São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Distrito Federal (DF) e Goiás (GO); clima tropical e semiárido no Nordeste, na Bahia (BA), Alagoas (AL), Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Piauí (PI); e clima predominantemente equatorial no Norte, nos estados do

Tocantins (TO), Pará (AM), Acre (AC), Rondônia (RO), Roraima (RR), Amazonas (AM) e Amapá (AP).

As amostras mais antigas em que o *Bd* foi detectado foram coletadas em 1894, mostrando a ocorrência de longo prazo deste fungo no Brasil favorecendo o desenvolvimento da linhagem brasileira (*Bd*-Brasil) (RODRIGUEZ et al., 2014). Embora a presença de *Bd* tenha sido detectada em todos os seis biomas brasileiros, há maior concentração de estudos e consequentemente maior número de anfíbios contaminados com *Bd* registrados no bioma Mata Atlântica brasileira, que foi altamente modificado antropogenicamente (Tabela 1). Além disso, os estudos sobre infecção por *Bd* foram mais numerosos na Mata Atlântica em comparação com os outros biomas. Por outro lado, a região do semiárido (Caatinga) é o bioma com menor quantidade de registros de infecção com *Bd* (Figura 2), paralelamente poucos estudos foram realizados nessa região.

O bioma Caatinga é predominante no semiárido brasileiro, consistindo cerca de 80% de área geográfica. O nome Caatinga foi criado do tupi-guarani, tradicionalmente, “Caa” significa mata, e “tinga” significa branca, conhecida também como sertão, agreste, cariri, etc, termos populares para denominar as diferentes vegetações desse bioma (MAIA et al., 2017). Possuindo uma grande diversidade de espécies de animais e muitas ainda para serem descobertas e/ou, descritas (FRANCISCO, 2013). Por esta razão, a Caatinga é considerada um bioma rico em recursos genéticos, quando comparamos com outras regiões semiáridas no mundo. Em contraste, o bioma Caatinga, é o menos estudado quanto à flora e à fauna, e tem sofrido degradações antrópicas (Maia et al., 2017). A Caatinga também é uma região que apresenta precipitações pluviométricas com média anual inferior a 800 mm, com índice de aridez de até 0,5 (balanço entre as precipitações e evapotranspiração), que torna o risco de seca nesse ambiente acima de 60%. Por outro lado, as serras e chapadas, principalmente as próximas da costa, ganham maiores volumes de precipitações, com temperaturas que variam em torno dos 26 °C (ALVES, et al., 2009; QUEIROZ, 2011).

O ritmo acelerado da detecção do *Bd* nos biomas brasileiros é alarmante. Devido à escassez de estudos e ao tamanho continental do país, é possível que muitas populações de anfíbios já estejam em declínio ou que as taxas de extinção estejam aumentando silenciosamente, portanto, medidas urgentes devem ser tomadas para entender o real estado da infecção por *Bd* no Brasil para orientar as ações de conservação.

Tabela 1- Áreas no Brasil com registros de anfíbios infectados com *Bd*. Mata Atlântica (MA); Floresta Amazônica (FA); Cerrado (CE); Caatinga (CA); Pantanal (PAN).

Município	Estado	# Espécies diagnosticadas com <i>Bd</i>	Biomás	Período de coleta	Referências
Cruzeiro do Sul, Porto Walter	AC	2	FA	1993-2009	Becker et al. (2016)
Rio Preto da Eva	AM	1	FA	1984	Becker et al. (2016)
Macapá	AP	1	FA	2005-2008	Becker et al. (2016)
Alta Floresta, Comodoro, Paranaíta, Porto Esperidião	MT	3	FA	1976-2009	Becker et al. (2016)
Altamira, Jacareacanga, Oriximiná, Santa Cruz Dos Martírios	PA	6	FA	1938-2013	Becker et al. (2016) Valencia-Aguilar et al. (2015)
Alto Paraíso, Espigão D'Oeste, Machadinho D'Oeste	RO	3	FA	1962-2001	Becker et al. (2016)
Amajari	RR	1	FA	1986	Becker et al. (2016)
Murici	AL	17	MA	2012-2015	Lisboa et al. (2013) Ruthsatz et al. (2020) Valencia-Aguilar et al. (2015)
Camacan, Camaçari, Camamu, Ibirapitanga, Igrapiúna, Itacaré, Mata de São João, Salvador	BA	12	MA	2004-2015	Ruthsatz et al. (2020) Amorim et al. (2019) Valencia-Aguilar et al. (2015)
Alfredo Chaves, Apiacá, Santa Leopoldina, Santa Teresa, Vargem Alta	ES	14	MA	1906-2015	Rodriguez et al. (2014) Ruthsatz et al. (2020)

Aiuruoca, Buenópolis, Caeté, Camanducaia, Carangola, Catas Altas, Congonhas do Norte, Itamonte, Jaboticatubas, Mariana, Passa Quatro, Poços de Caldas, São Roque de Minas	MG	22	MA	1905-2010	Rodriguez et al. (2014) Valencia-Aguilar et al. (2015) Gründler et al. (2012) Toledo et al. (2006a) Toledo et al. (2006b) Ferreira et al. (2008) Carnaval et al. (2006) Carnaval et al. (2005)
Jaqueira, Poção	PE	3	MA	2001-2014	Valencia-Aguilar et al. (2015) Carnaval et al. (2006)
Guaratuba, Ibaiti, Marumbi, Morretes, Pinhão, Piraquara	PR	14	MA	1898-2015	Rodriguez et al. (2014) Ruthsatz et al. (2020) Vieira et al. (2012)
Angra dos Reis, Cabo Frio, Campos dos Goytacazes, Engenheiro Paulo de Frontin, Itaguaí, Itatiaia, Jacarepaguá, Macaé, Nova Friburgo, Nova Iguaçu, Petrópolis, Resende, Rio de Janeiro, São Gonçalo, Teresópolis, Valença	RJ	57	MA	1901-2015	Rodriguez et al. (2014) Ruthsatz et al. (2020) Ruggeri et al. (2018) Toledo et al. (2006a) Carnaval et al. (2006) Brito-Gitirana et al. (2009)
Baía Formosa	RN	1	MA	2012-2015	Ruthsatz et al. (2020)
Barracão, Cambará do Sul, Canela, Caxias do Sul, Dom Pedro de Alcântara, Erechim, Gramado, Itaqui, Itati, Monte Alegre dos Campos, Santa Maria, São Borja, São Francisco de Paula, São Lourenço do Sul, Sapiranga, Torres, Três Cachoeiras, Vacaria	RS	18	MA	1894-2015	Rodriguez et al. (2014) Becker and Zamudio (2011) Toledo et al. (2006a) Ruthsatz et al. (2020)
Blumenau, Bombinhas, Corupá, Florianópolis, Ibirama, Joinville, Lages, Laguna, Lauro Muller, Navegantes, Novo Horizonte, Palhoça, Pomerode, Porto Belo, Rancho Queimado, Santo Amaro da Imperatriz, São Bento do Sul, São Miguel do Oeste, Seara, Timbé do Sul, Timbó	SC	36	MA	1901-2015	Rodriguez et al. (2014) Toledo et al. (2006a) Ruthsatz et al. (2020) Preuss et al. (2015) Preuss et al. (2016)

Americana, Apiaí, Bauru, Bertioga, Botucatu, Caçapava, Campos do Jordão, Capivari, Caraguatatuba, Cotia, Cubatão, Ferraz de Vasconcelos, Francisco Morato, Guarujá, Iguape, Ilhabela, Iporanga, Itanhaém, Itapetininga, Itapeva, Itariri, Jaboticabal, Jundiaí, Juquiá, Mairiporã, Marília, Natividade da Serra, Paulínia, Pedro de Toledo, Peruibe, Pindamonhangaba, Piquete, Piracicaba, Piraju, Praia da Enseada, Praia Grande, Queluz, Ribeirão Pires, Rio Claro, Rio Grande da Serra, Salesópolis, Santo André, Santo Antônio do Pinhal, São Bernardo do Campo, São José do Barreiro, São Luís do Paraitinga, São Paulo, São Sebastião, São Vicente, Ubatuba	SP	88	MA	1896-2015	Rodriguez et al. (2014) Carnaval et al. (2006) Toledo et al. (2006a) Ruthsatz et al. (2020) Gründler et al. (2012) Vieira et al. (2013) Becker and Zamudio (2011) Ruggeri et al. (2015) Ferreira et al. (2008) Coutinho et al. (2015) Paula (2011)
Barra, Gentio do Ouro, Piatã, Rio de Contas, Serra do Ramalho	BA	5	CA	1996-2014	Amorim et al. (2019)
Picos	PI	2	CA	2017	Benício et al. (2019)
Barreiras	BA	1	CE	2009	Amorim et al. (2019)
Planaltina	DF	9	CE	2013	Ramalho (2015)
Alto Paraíso de Goiás, Anápolis, Montes Claros de Goiás, Pirenópolis	GO	4	CE	2009-2010	Ramalho et al. (2013) Becker et al. (2016)
Coxim	MS	1	CE	1980	Becker et al. (2016)
Lucas do Rio Verde	MT	1	CE	2010	Becker et al. (2016)
Gurupi, Lizarda, Porto Nacional	TO	3	CE	2006-2011	Becker et al. (2016)

Santo Antônio do Leverger

MT

1

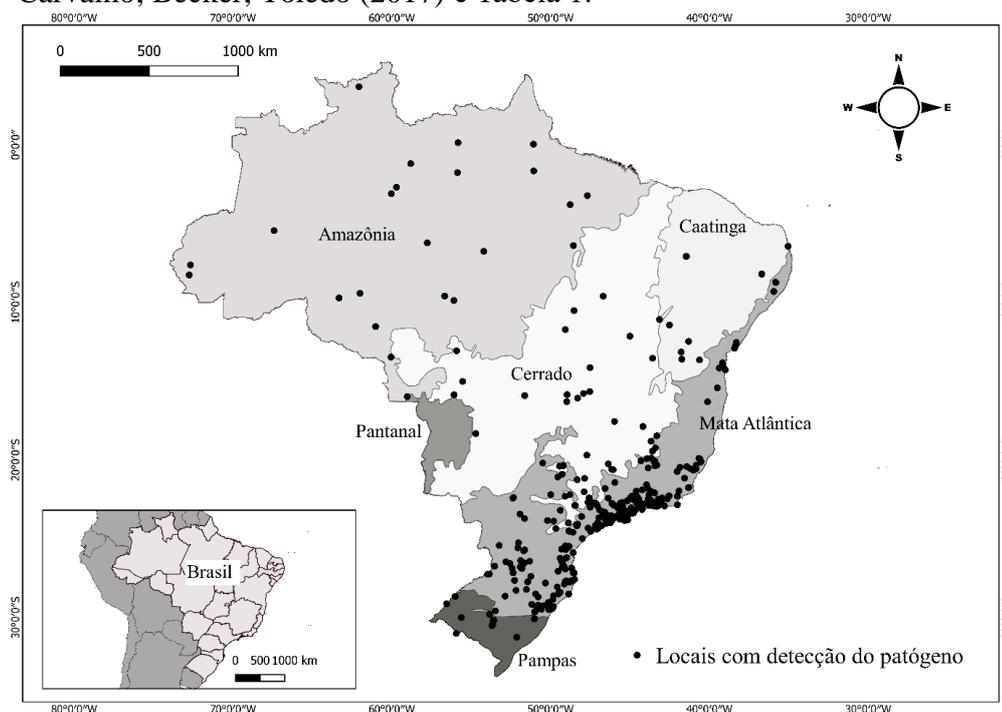
PAN

1963

Becker et al. (2016)

Fonte: (BEZERRA, et al., 2021) com adaptações realizadas pela autora. Artigo submetido.

Figura 2- Mapa com os locais onde foi registrada a incidência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* nos biomas brasileiros. Dados obtidos de Carvalho; Becker; Toledo (2017) e Tabela 1.



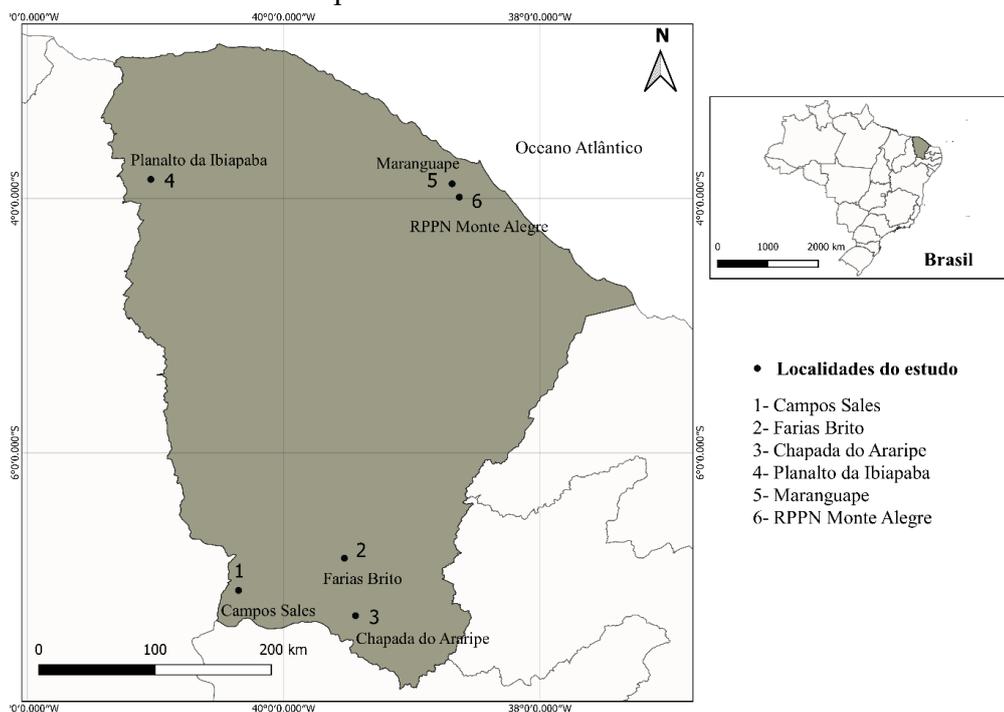
Fonte: Elaborado pela autora (Software QGIS 3.10.10).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de dados

As coletas foram realizadas tanto na estação seca (julho e agosto de 2019), quanto na estação chuvosa (janeiro, fevereiro e março de 2020), em seis localidades do estado do Ceará (Figura 3), incluindo áreas mais úmidas em brejos de altitude e áreas mais secas de caatinga sensu stricto: RPPN Monte Alegre localizada em Pacatuba ($3^{\circ}59'22.1''S$ $38^{\circ}37'44.5''W$ – brejo de altitude); Chapada do Araripe ($7^{\circ}16'47.5''S$ $39^{\circ}26'18''W$ – brejo de altitude), município do Crato; Farias Brito ($6^{\circ}49'41.8''S$ $39^{\circ}31'33.7''W$ - Caatinga); Serra de Maranguape ($03^{\circ}53'05''S$ $38^{\circ}41'06''W$ – brejo de altitude), Planalto da Ibiapaba ($3^{\circ}53'05''S$ $38^{\circ}41'06''W$ – brejo de altitude) e Campos Sales ($7^{\circ}04'53.6''S$ $40^{\circ}19'23.7''W$ - Caatinga). Foi realizada apenas uma coleta para cada localidade, com exceção da localidade RPPN Monte Alegre em que foram realizadas cinco expedições em campo. Foram coletados, em média, cinco exemplares de cada espécie por localidade. Licenças para coletas 68784 e 29613 emitida pelo Ministério do Meio Ambiente - SISBIO.

Figura 3- Mapa do estado do Ceará, Brasil, com os pontos onde foram realizadas as coletas do presente estudo.



Fonte: Elaborado pela autora (Software QGIS 3.10.10).

3.2 Amostragem

A captura de espécimes de anuros para análise foi realizada manualmente através de busca ativa. Em seguida à captura, os espécimes foram lavados com água ultrapura, identificados e fotografados. Amostras da pele foram colhidas com o uso de *swabs* estéreis prontos para uso (Figura 4), que foram passados de 5 a 7 vezes na parte ventral e inguinal, coxas e pés do animal, com objetivo de garantir amostragem confiável (HYATT et al., 2007). Seguindo as recomendações de Lambertini et al. (2013) foram utilizadas luvas individuais para cada espécime coletado, garantindo a integridade da amostra e evitando contaminação cruzada. As amostras de *swab* coletadas foram colocadas em tubos criogênicos secos de 1,5 mL que foram inseridos em caixas térmicas refrigeradas com gelo onde permaneceram até serem levados ao laboratório onde foram armazenados em temperatura de -20°C até serem utilizados no processo de extração de DNA.

Figura 4- Coleta de material biológico com *swab* realizado na RPPN Monte Alegre em Pacatuba, Ce (*Scinax x-signatus*). Foto: Saulo G. S. Bezerra.



Os indivíduos capturados foram avaliados quanto à presença de alguns sinais clínicos relacionados à quitridiomicose, como: pigmentação anormal da pele, descamação epidérmica, irregularidades no tecido epitelial, erosões (hiperqueratose) ou hiperplasia (CECCON, 2019). Logo após a inspeção e coleta de material, os animais foram liberados de volta ao ambiente.

3.3 Extração do material genético

A extração de DNA dos *swabs* foi realizada seguindo o protocolo descrito por Boyle et al. (2004), com alterações feitas por Lambertini et al. (2013). Foram adicionados 50 μL do reagente PrepMan ULTRA® (Applied Biosystems) a cada tubo tipo *ependorf* contendo o *swab*. Seguiu-se com agitação em vórtex por 45 segundos, centrifugação por 30 segundos a 12.000 RPM, mais uma vez agitação em vórtex por 45 segundos e centrifugação por 30 segundos a 12.000 RPM. As amostras foram aquecidas por 10 minutos no ThermoMixer, resfriadas em temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugadas por 1 minuto a 12.000 RPM. Inverteu-se o *swab* dentro do *ependorf*, utilizando pinças flambadas a cada inversão, centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 RPM e descartaram-se os *swabs*. Os tubos foram centrifugados por alguns segundos e 45 μL da solução foram transferidos para novos tubos tipo *ependorfs*, onde foram centrifugados, uma última vez, por 10 minutos a 12.000 RPM.

3.4 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo de Kosch e Summers (2013), com algumas modificações. Foram utilizados os iniciadores específicos para *Bd* (*Bd* 1a: 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3', *Bd* 2a: 5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') desenvolvidos por Annis et al. (2004). A reação de PCR consistiu em: 5 µL de GoTaq Buffer 5x, 3µL de MgCl₂ (25mM), 0,5 de dNTPs (1000 µM), 5 µL de cada primer (5 µM), 0,2 µL de Taq Polymerase (5U) 1,3 µL de água, resultando em um Mix de 20 µL, foi adicionada a BSA em uma concentração final de 400ng/µL para cada tubo contendo a mistura de PCR, e 5 µL (diluição a 100ng) de DNA da amostra para um volume total de reação de 35 µL, incluindo a BSA. Foi utilizado um controle negativo com água destilada em substituição ao DNA que foi adicionado à reação. As condições do Termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 44 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Após o término da PCR, foram utilizados 8 µL de cada amostra amplificada para análise em gel de agarose 2%, juntamente com DNA *ladder* como um padrão de tamanho de DNA. O gel foi corado com SYBRsafe e visualizado no fotodocumentador de luz ultravioleta. O resultado foi considerado positivo para o patógeno *Bd* quando foram visualizadas bandas de amplificação de aproximadamente 300pb (pares de bases). Esse método foi utilizado para todos os testes.

Tabela 2 - Concentrações finais utilizadas na reação de PCR para 35 µL.

Reagentes (Promega)	Concentração final
DNA (100ng/ µL)	600ng
Tampão (5X)	1X
MgCl₂ (25 mM)	3mM
dNTPs (10 mM)	0,2mM
Primer Bd1a (5 µM)	1 µM
Primer Bd2a (5 µM)	1 µM
BSA (1mg/ µL)	0,4 µg/ µL
DNA polimerase (5U)	0,4 U

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Purificação e precipitação do DNA amplificado

Como forma de validar o protocolo de PCR, alguns produtos de PCR com a amplificação confirmada foram purificados com acetato de potássio e álcool. Para isso, 72 µL do produto de PCR (equivalente à reação de PCR em triplicata, em torno de ~30,6 µL) foram adicionadas a 7,2 µL de uma solução 3 M de acetato de potássio (pH 5,5) e 2 vezes o volume total da solução de etanol 100%. Após a homogeneização por inversão, as soluções foram refrigeradas a temperatura de -80 °C por 30 min. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rcf, 4°C, por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado com 150 µL de etanol 70% gelado e, em seguida foi centrifugado a 14.000 rpm, 4°C, por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi secado em banho seco a 36°C por aproximadamente 20 min. Quando foi possível observar toda a evaporação do álcool, o DNA purificado e precipitado foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura livre de DNases e RNases. A confirmação da retirada de impurezas das amostras foi observada pela concentração final (ng/µL), sendo superior a 50 ng/µL, e pelas relações a 260/230 nm e 260/280 nm quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

3.6 Sequenciamento dos produtos de PCR

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de sequenciamento de SANGER através da empresa Macrogen Inc., Seul, Coreia (www.macrogen.com). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os iniciadores específicos para *Bd* (*Bd* 1a: 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3', (*Bd* 2a: 5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') desenvolvidos por Annis et al. (2004) (Amostras escolhidas para sequenciamento: CS11, CS13 – Campos Sales, FB02 – Farias Brito, PA27 – RPPN Monte Alegre, PI01 – Planalto da Ibiapaba e SA18 – Chapada do Araripe). As sequências parciais fornecidas pela empresa Macrogen Inc. foram de alta qualidade (Phred >20) e utilizadas para gerar sequências consenso usando o programa *Codon Code Aligner* versão 6.0.2 (Codon Code Corp, USA). Posteriormente, as sequências consenso foram submetidas a identificação molecular na ferramenta de alinhamento local BLAST (ALTSCHUL, 1990), utilizando o banco de dados *nucleotide collection*.

4 RESULTADOS

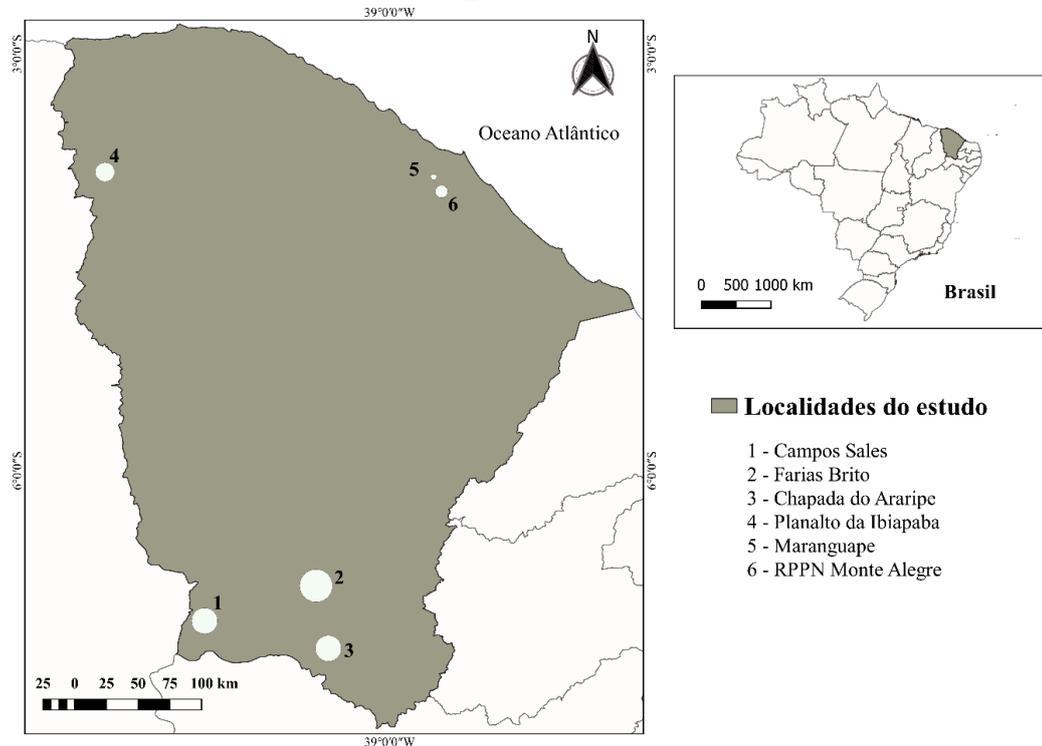
4.1 Coleta

Foram colhidas amostras de 210 indivíduos capturados: (57 na RPPN Monte Alegre, 17 em Campos Sales, 18 na Chapada do Araripe, 22 em Farias Brito, 42 na Serra de Maranguape, 54 no Planalto da Ibiapaba) (Figura 5) distribuídos em 28 espécies diferentes (Tabela 03). As amostras de cada espécie por local foram analisadas até a detecção do *Bd*, na continuação de resultados negativos as amostras iam sendo testadas até o final, compreendendo um total de 125 amostras submetidas à extração de DNA e análise por PCR, e 40 amostras com resultado positivo.

4.2 Detecção do *Batrachochytrium dendrobatidis* por PCR

Entre as 28 espécies de anuros coletadas, 20 (69 %) apresentaram indivíduos positivos para *Bd* em pelo menos uma localidade, do total de amostras testadas por PCR (125 amostras). Todas as seis localidades amostradas apresentaram exemplares de, pelo menos, uma espécie, com resultado positivo para detecção do *Bd* (Tabela 3). No presente estudo foi detectada, pela primeira vez, a presença do fungo *Bd* em populações de anuros residentes no estado do Ceará. As espécies que apresentaram contaminação pelo *Bd* estão distribuídas em seis famílias: Bufonidae, Craugastoridae, Hylidae, Leptodactylidae, Odontophrynidae e Phyllomedusidae.

Figura 5- Mapa do estado do Ceará, Brasil, com os pontos onde foram realizadas as coletas do presente estudo. O diâmetro do círculo é proporcional à porcentagem de espécies que foram detectadas com *Bd* para cada local. Número de espécies amostradas/número e porcentagem de espécies com resultado positivo 1- Campos Sales 11/7 (63,64%). 2- Farias Brito 8/7 (87,5%). 3- Chapada do Araripe 9/6 (66,6%). 4- Planalto da Ibiapaba 14/6 (42,96%). 5- Maranguape 14/1(7,14%). 6- RPPN Monte Alegre 13/5 (38,46%).



Fonte: Elaborado pela autora (Software QGIS 3.10.10).

Figura 6 – Gel de Eletroforese agarose 2% com amplificação por PCR (300pb).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3- Espécies de anuros distribuídas nas suas respectivas famílias taxonômicas e locais de amostragem. (0) representa que a espécie não foi coletada no local, (+) representa que a espécie apresentou resultado positivo para *Batrachochytrium dendrobatidis* no local, e (-) representa que a espécie apresentou resultado negativo para o *Bd*.

Família	Espécie	RPPN					
		Campos Sales	Chapada do Araripe	Farias Brito	Planalto da Ibiapaba	Monte Alegre	Maranguape
Bufonidae	<i>Rhinella diptycha</i>	-	+	0	+	-	-
	<i>Rhinella granulosa</i>	-	-	0	-	-	0
Craugastoridae	<i>Pristimantis sp</i>	0	0	0	+	-	-
Eleutherodactylidae	<i>Adelophryne maranguapensis</i>	0	0	0	0	0	-
Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	0	0	+	+	0	-
	<i>Corythomantis greeningi</i>	0	0	0	+	0	0
	<i>Dendropsophus minusculus</i>	0	0	0	0	-	-
	<i>Dendropsophus minutus</i>	0	+	0	-	+	-
	<i>Dendropsophus nanus</i>	0	0	+	+	0	0
	<i>Dendropsophus soaresi</i>	+	0	0	-	0	0
	<i>Scinax x-signatus</i>	-	+	+	-	+	0
	<i>Trachycephalus typhonius</i>	0	0	0	0	0	-
Leptodactylidae	<i>Adenomera juikitam</i>	0	+	0	0	-	-
	<i>Leptodactylus fuscus</i>	+	0	+	0	-	0
	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	+	0	+	-	0	-
	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	0	0	0	0	+	-
	<i>Leptodactylus troglodytes</i>	+	-	0	+	0	0
	<i>Leptodactylus vastus</i>	0	-	0	0	+	-
	<i>Physalaemus albifrons</i>	+	0	-	0	0	0
	<i>Physalaemus cicada</i>	+	0	0	0	0	0
	<i>Physalaemus cuvieri</i>	0	+	+	-	+	+
	<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	0	0	+	0	0	0
<i>Pseudopaludicola pocoto</i>	-	0	0	0	0	0	

Microhylidae	<i>Elachistocleis cesarii</i>	0	0	0	0	-	0
Odontophrynidae	<i>Proceratophrys ararype</i>	0	+	0	0	0	0
	<i>Proceratophrys cristiceps</i>	0	0	0	-	-	-
	<i>Proceratophrys renalis</i>	0	0	0	0	0	-
Phyllomedusidae	<i>Pithecopus gonzagai</i>	+	0	0	-	0	0
Total de espécies amostradas		11	9	8	17	13	14

Fonte: Elaborado pela autora.

As vinte espécies que apresentaram indivíduos positivos para *Bd* no presente estudo apresentam padrões de distribuição variados, conforme mostra a tabela 4 a seguir:

Tabela 4- Espécies que apresentaram indivíduos positivos para *Batrachochytrium dendrobatidis* no presente trabalho, junto com suas áreas de distribuição, Bioma/Vegetação de ocorrência e status de conservação de acordo com IUCN (2021), Fonte: Frost (2021).

Espécie	Distribuição	Bioma/Vegetação	IUCN
<i>Rhinella diptycha</i>	Pará, Nordeste do Brasil em direção sul até Argentina, Uruguai. Bolívia e Paraguai.	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Pristimantis sp.</i>	Nordeste do Brasil	Florestas Úmidas em Brejos de Altitude	Não consta na lista da IUCN
<i>Boana raniceps</i>	Colômbia amazônica, Venezuela, Guiana Francesa, leste do Brasil, Ceará, Paraguai, norte da Argentina e leste da Bolívia.	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Corythomantis greeningi</i>	Nordeste do Brasil. Tocantins e Goiás	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Dendropsophus minutus</i>	América do Sul ao leste dos Andes, da Venezuela e Guianas em direção sul até Argentina	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Dendropsophus nanus</i>	Norte e Nordeste do Brasil em direção Sul até Argentina, Paraguai e Bolívia	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Dendropsophus soaresi</i>	Nordeste do Brasil e Minas Gerais	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Scinax x-signatus</i>	Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Adenomera juikitam</i>	Amazônia e Brejos de altitude do Nordeste	Florestas Úmidas	Menor preocupação
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Panamá e América do Sul à leste dos Andes até o norte da Argentina	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	América do Sul, da região Amazônica até o norte da Argentina	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Região Amazônica da América do Sul. Brejos de Altitude do nordeste do Brasil. Minas Gerais, São Paulo e Paraná em área de Mata Atlântica.	Florestas Úmidas/Cerrado	Menor preocupação
<i>Leptodactylus troglodytes</i>	Nordeste do Brasil, Minas Gerais e Goiás	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Leptodactylus vastus</i>	Nordeste do Brasil	Florestas	Menor preocupação

		Úmidas/Cerrado/Caatinga	
<i>Physalaemus albifrons</i>	Nordeste do Brasil e Minas Gerais	Caatinga e Cerrado	Menor preocupação
<i>Physalaemus cicada</i>	Nordeste do Brasil e Minas Gerais	Caatinga e zonas de transição caatinga/cerrado	Menor preocupação
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Nordeste, Centro e Sul do Brasil. Argentina, Paraguai, Bolívia e Venezuela.	Florestas Úmidas/Cerrado/Caatinga	Menor preocupação
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Argentina e Paraguai.	Brejos de altitude/Florestas úmidas	Menor preocupação
<i>Proceratophrys ararype</i>	Chapada do Araripe	Floresta Úmida em Brejos de Altitude	Não consta na lista da IUCN
<i>Pithecopus gonzagai</i>	Nordeste do Brasil ao Norte do rio São Francisco	Florestas úmidas/cerrado e caatinga	Menor preocupação

Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Identificação Molecular

A tabela 5 mostra o resultado da identificação molecular das sequências obtidas após sequenciamento dos produtos de PCR das amostras CS11, CS13, FB02, PA27, PI01 e SA18. Todas as cinco amostras escolhidas aleatoriamente para o sequenciamento apresentaram o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* como espécie mais relacionada no GenBank, confirmando a presença do *Bd* nos isolados testados e, conseqüentemente, a especificidade do ensaio de PCR realizado no presente estudo para o *Bd*.

Tabela 5- Espécie mais relacionada no GenBank com as sequências consensos referentes ao RNAr 5.8S obtidas das amostras CS11, CS13, FB02, PA27, PU01 E CA18. Legenda: CS = Campos Sales, FB = Farias Brito, PA = RPPN Monte Alegre, PI = Planalto da Ibiapaba, CA = Chapada do Araripe.

Amostras	pb	Espécie mais relacionada no GenBank (número de acesso)	Identidade	Cobertura	E-value
CS11	292	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (HQ176489.1)	99,00%	100%	3,00E-147
CS13	293	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582937.1)	99,00%	100%	6,00E-130
FB02	296	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582937.1)	100,00%	100%	1,00E-151
PA27	291	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JN870749.1)	99,00%	92%	2,00E-144
PI01	285	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582940.1)	99,85%	99%	1,00E-141
CA18	295	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (JQ582937.1)	100,00%	97%	3,00E-147

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise geral do estudo

O presente trabalho é o primeiro a investigar a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em populações de anuros presentes no estado do Ceará. Os indivíduos foram coletados em vários locais abrangendo mais de uma fitofisionomia no Ceará, de forma a trazer um resultado atualizado sobre a presença do patógeno no estado.

O Ceará se encontra no bioma Caatinga, onde predominam regiões de clima semiárido, abrigando uma fauna formada, principalmente, por espécies de formações vegetacionais abertas. No entanto, em algumas localidades, encontramos áreas que apresentam vegetação típica do Cerrado e florestas tropicais úmidas, o que vem a contribuir para a complexidade de paisagens que está ligada a significativa diversidade de espécies presente no estado (LOEBMANN; ROBERTO; LOEBMANN, 2016). Este estudo abrangeu coletas em seis pontos do estado do Ceará, compreendendo vegetação típica de Caatinga (Farias Brito e Campos Sales) e florestas tropicais úmidas (Serra de Maranguape, RPPN Monte Alegre, Chapada do Araripe e Planalto da Ibiapaba)

A biodiversidade do bioma Caatinga foi, por muito tempo, subestimada, mesmo apresentando um significativo número de espécies de animais, incluindo alguns endemismos. A fauna de anfíbios do bioma Caatinga, por exemplo, é formada por, pelo menos, 98 espécies, incluindo 20 formas endêmicas (GARDA et al. 2017) Apesar dos estudos sobre a herpetofauna local terem sido intensificados ao longo dos últimos anos, a Caatinga ainda se encontra entre as regiões brasileiras mais negligenciadas quando se trata de conservação (ROBERTO; LOEBMANN, 2016, FERREIRA; CLAUDIO; ÁVILA, 2018).

A ocorrência do fungo *Bd* em anuros do semiárido de outros estados do nordeste brasileiro já tinha sido anteriormente investigada. Amorim et al. (2019) realizaram testes em 190 indivíduos de 85 espécies, coletados no estado da Bahia e preservados em coleções, com 16 amostras de 14 espécies apresentando resultado positivo para *Bd*. Exemplares das espécies *Rhinella granulosa* e *R. diptycha* tiveram amostras, de 20 exemplares cada, coletadas no Piauí e testadas para *Bd*, apresentando prevalência igual a 20% e 30%, respectivamente (BENÍCIO et al. 2019).

Quando comparamos trabalhos realizados com material de coleção com trabalhos realizados a partir de coletas podemos obter diferentes respostas. Trabalhos realizados em coleções possuem a vantagem de oferecer informações da presença do *Bd* em diferentes anos e

com isso revelar a história da infecção do *Bd* em determinado local, como por exemplo o trabalho realizado por Carvalho; Becker; Toledo (2017). Por outro lado, a efetividade do ensaio de investigação do *Bd* em animais de coleções depende bastante do estado de armazenamento das amostras. Por sua vez, trabalhos realizados com a captura do animal em campo fornecem uma resposta atual da contaminação com o *Bd* em determinado local (LAMBERTINI et al., 2021), além de possibilitar a realização de ensaios com amostras frescas.

Em outras regiões do Brasil, vários outros trabalhos investigaram a presença do fungo *Bd*, Ramalho (2015) realizou um estudo em Lagoa Bonita, na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE), região de Planaltina no Distrito Federal. Esse trabalho teve um esforço amostral de 318 indivíduos, que incluiu 16 espécies, de 5 famílias, tendo sido obtido 46 amostras positivas (14,47%), nas quais 10 espécies apresentaram resultados positivo para o fungo. O mesmo trabalho também traz o primeiro registro de 2 espécies endêmicas do bioma Cerrado infectadas com *Bd*, localizadas no estado de Goiás, *Bokermannohyla pseudopseudis* e *Bokermannohyla sapiranga*, com prevalências de 60% e 71%, respectivamente.

Valencia-Aguilar et al. (2015) coletaram 90 indivíduos de 27 espécies, tendo sido obtido resultado positivo para o *Bd* em 22 espécies (39 espécimes). O trabalho consistiu em avaliar a incidência do fungo em regiões pouco exploradas que estavam distribuídas em 4 localidades da Mata Atlântica brasileira: Bahia, Pernambuco, Minas Gerais, Alagoas e uma localidade de Floresta Amazônica no Pará. O mesmo trabalho contribuiu com o primeiro registro positivo para *Bd* em um anuro capturado em estado selvagem na Amazônia (*Adelphobates galactonotus*).

Ceccon (2019) coletou amostras de 132 indivíduos, sendo 33 de espécimes recapturados mais de uma vez em campo da espécie *Limnomedusa macroglossa*. O trabalho foi realizado no município de Três Barras do Paraná, no estado do Paraná, e teve como resultado positivo para *Bd* em 31 amostras, com prevalência de 17,4%.

Alguns trabalhos abrangeram maior número de localidades brasileiras e de espécies de anuros adultos ou girinos, entre os quais se destacam: Rodriguez et al. (2014) que testou 2.799 anuros pós-metamórficos de coleções entre os anos 1894 a 2010, focando na Mata Atlântica do Brasil, e obtendo o registro do *Bd* mais antigo no Brasil (1894); Becker et al. (2016) que verificou a presença do fungo *Bd* em 1.391 anuros preservados, espécimes pós-metamórficos da Amazônia e ecorregiões de 1895 a 2014, e Carvalho; Becker; Toledo, (2017) que examinaram 32.551 girinos de museus de 1930 a 2015.

5.2 Localidades do estudo

Campos Sales é um município localizado na microrregião da Chapada do Araripe, com altitude de 567 m, clima tropical quente semiárido e vegetação predominante da Caatinga (Fonte: <https://www.campossales.ce.gov.br/>). Em Campos Sales foram coletadas amostras de 17 indivíduos de 11 espécies diferentes. Todas as amostras foram testadas com resultado positivo para o patógeno *Bd* em 9 amostras distribuídas em 7 espécies.

A Chapada do Araripe localiza-se no sul do estado do Ceará, sendo que o local onde foi realizado a amostragem possui uma vegetação de floresta tropical perenifólia desenvolvida sob clima de temperaturas amenas, com muitas precipitações e umidade atmosférica elevada (CAVALCANTI; PUTZKE, 1998). Na Chapada do Araripe foram coletadas e testadas amostras de 18 indivíduos de 9 espécies diferentes, com resultado positivo para *Bd* em 11 amostras de 6 espécies.

O Município de Farias Brito localiza-se em área com vegetação típica de Caatinga. Neste município foram amostrados indivíduos pertencentes a 8 espécies, com amostras de sete espécies (88 %) apresentando resultado positivo para *Bd*.

No Planalto da Ibiapaba foram realizadas coletas em áreas que representam um dos brejos de altitude do Ceará. Foram amostrados 54 indivíduos de 14 espécies, com resultado positivo para *Bd* em indivíduos de 6 destas espécies (43%).

A RPPN Monte Alegre localiza-se na Serra de Aratanha, que constitui uma Área de Proteção Ambiental (APA). Na RPPN Monte Alegre foram coletadas amostras de 14 espécies, com resultados positivos para *Bd* apresentados em amostras de 5 espécies (36%).

A Serra de Maranguape encontra-se também incluída dentro de uma APA (Área de Proteção Ambiental). Em Maranguape foram amostrados indivíduos de 14 espécies, com apenas uma delas (7%) apresentando resultado positivo para *Bd*.

As localidades de Campos Sales e Farias Brito (com temperaturas mais elevadas e vegetação de Caatinga) e a Chapada do Araripe (com temperaturas mais baixas e vegetação de floresta úmida) encontram-se relativamente próximas, localizando-se na mesma mesorregião do estado do Ceará. Quando comparamos os resultados obtidos nessas três localidades, observamos que a porcentagem de espécies contaminadas por *Bd* foi maior em Farias Brito (88%, a maior entre todos os pontos amostrados), enquanto Campos Sales e a Chapada Araripe apresentaram valores próximos (64 e 67 %, respectivamente). Por outro lado, quando comparamos a prevalência de *Bd* para o total de indivíduos testados, Campos Sales apresentou um valor menor (53%) que a Chapada do Araripe (61%). Esses resultados parecem suportar

apenas em parte, a hipótese que o *Bd* é favorecido por ambientes mais úmidos (SCHEELE et al. 2019).

Na realidade, as porcentagens de espécies contaminadas por *Bd* nas áreas localizadas nos brejos de altitude (Chapada do Araripe 67%, Planalto da Ibiapaba 43%, RPPN Monte Alegre 36% e Serra de Maranguape 7%) foram inferiores às porcentagens registradas nas áreas mais baixas com vegetação de Caatinga (Campos Sales 64% e Farias Brito 88 %), sugerindo que o *Bd* não seria favorecido, na nossa região, por ambientes mais mésicos e com temperaturas mais baixas.

5.3 Espécies com resultado positivo para o patógeno no estudo

Um pouco mais da metade (11 espécies) apresenta distribuição ampla que engloba grande parte da América do Sul e variados biomas, enquanto as demais oito espécies (*Pristimantis sp.*, *Corythomantis greeningi*, *Dendropsophus soaresi*, *Leptodactylus troglodytes*, *L. vastus*, *Physalaemus albifrons*, *P. cicada*, *Proceratophrys ararype* e *Pithecopus gonzagai*) têm distribuição restrita ao bioma Caatinga do nordeste brasileiro, incluindo áreas em estados vizinhos ao Nordeste, em algumas dessas espécies. Entre as espécies restritas ao Nordeste e estados vizinhos, *C. greeningi*, *D. soaresi*, *L. troglodytes*, *L. vastus* e *P. gonzagai* ocorrem tanto em matas úmidas quanto em formações vegetacionais abertas (Cerrado e Caatinga), *P. albifrons* e *P. cicada* ocorrem apenas em áreas de cerrado e caatinga e *Pristimantis sp.* e *P. ararype* são encontrados apenas em matas úmidas de brejos de altitude, sendo que a última espécie é endêmica da Chapada do Araripe.

A localidade de Maranguape se mostrou particularmente interessante, pois teve o maior número de espécies amostradas (14) com apenas uma (*Physalaemus cuvieri*) com resultado positivo. Vale destacar que, entre as espécies com resultado negativo para *Bd* em Maranguape, encontra-se *Adelophryne maranguapensis*, endêmica daquele brejo de altitude e considerada ameaçada de extinção (SILVANO; BORGES-NOJOSA, 2004).

Entre as vinte espécies com resultado positivo para o fungo *B. dendrobatidis*, 10 representam os primeiros registros de infecção por *Bd* no Brasil: *Boana raniceps*, *Dendropsophus nanus*, *D. soaresi*, *Scinax x-signatus*, *Leptodactylus troglodytes*, *L. vastus*, *Physalaemus cicada*, *Pseudopaludicola mystacalis*, *Proceratophrys ararype* e *Adenomera juikitam*.

Rhinella diptycha (Cope, 1862) (Bufonidae): anuro considerado de grande porte, popularmente conhecido como sapo cururu. Na reprodução os ovos são depositados em água

parada, eclodindo em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). Benício et al. (2019) já tinham previamente registrado contaminação por *Bd* em exemplares de *R. diptycha* no estado vizinho do Piauí. No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo nas amostras coletadas na Chapada do Araripe e no Planalto da Ibiapaba e negativo nas amostras coletadas em Campos Sales, RPPN Monte Alegre e Maranguape.

Pristimantis sp.: espécie em processo de descrição (Igor Joventino Roberto com. pess.) presente em florestas úmidas, ocorrendo nas Serras de Baturité, Maranguape, Aratanha e no Planalto da Ibiapaba (ROBERTO; LOEBMANN, 2016). Os animais capturados estavam em árvores ou vegetações baixas no local de coleta. No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo para *Bd* nas amostras coletadas no Planalto da Ibiapaba e negativo para as amostras coletadas em Maranguape e RPPN Monte Alegre.

As espécies do gênero *Pristimantis* depositam ovos terrestres com desenvolvimento direto. Espécies terrestres que se reproduzem fora da água estão menos expostas à contaminação por um fungo transportado pela água como o *Bd*, ainda que o mesmo já tenha sido registrado em alguns anuros com estas características (MESQUITA et al., 2017). Por outro lado, estudos mostraram que está menor exposição pode levar à falta de respostas adaptativas ao fungo e, conseqüentemente, uma maior suscetibilidade em comparação com espécies que apresentam larvas aquáticas (MESQUITA et al. 2017).

Isso torna particularmente preocupante o registro do fungo em *Pristimantis sp.*, por se tratar de uma espécie com distribuição restrita aos brejos de altitude que já sofrem significativos impactos antrópicos. Registros de *Bd* para outras espécies de *Pristimantis* já foram feitos por Valencia-Aguilar et al. (2015) para *P. ramagii* e *P. vinhai* e por Amorim et al. (2019) para *P. paulodutraii*.

Boana raniceps (Cope, 1862) (Hylidae): os ovos dessa espécie são depositados diretamente na água, onde eclodem como girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas em Farias Brito e Planalto da Ibiapaba e negativo para as amostras coletadas em Maranguape. O fungo *Bd* já tinha sido registrado em outras espécies do gênero no Brasil (VALENCIA-AGUILAR et al., 2015; RUTHSATZ et al., 2020).

Corythomantis greeningi Boulenger, 1896 (Hylidae): distribuição geográfica associada principalmente ao bioma Caatinga, vive ou busca refúgio em bromélias, buracos em árvores, fendas rochosas (GODINHO; MOURA; FEIO, 2013). A reprodução ocorre em corpos de água temporários, onde os ovos ficam fixos às rochas até a eclosão de larvas exotróficas, que também podem se fixar nas rochas (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente

trabalho, esta espécie foi coletada apenas na localidade do Planalto da Ibiapaba, apresentando resultado positivo. Registros de *Bd* em indivíduos desta espécie já tinham sido anteriormente feitos por Amorim et al. (2019).

Dendropsophus minutus (Peters, 1872) (Hylidae): espécie de pequeno porte distribuída de forma ampla na Região Neotropical. Se reproduzem depositando ovos que eclodem em girinos exotróficos em água parada (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas na Chapada Araripe e RPPN Monte Alegre e negativo para as amostras coletadas em Maranguape e Planalto da Ibiapaba. O fungo *Bd* já tinha sido registrado para esta espécie, em regiões diversas do Brasil (PAULA, 2011; BECKER; ZAMUDIO, 2011; RODRIGUEZ et al., 2014; COUTINHO et al., 2015; VALENCIA-AGUILAR et al., 2015; RAMALHO 2015; PREUSS et al. 2016; RUTHSATZ et al.2020).

Dendropsophus nanus (Boulenger, 1889) (Hylidae): se reproduz em corpos de água parada onde são depositados ovos que eclodem em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie foi coletada em Farias Brito e Planalto da Ibiapaba, com resultado positivo em ambas.

Dendropsophus soaresi (Caramaschi e Jim, 1983) (Hylidae): Como nas demais espécies do gênero, a reprodução ocorre através da deposição, em corpos de água, de ovos que posteriormente, eclodem em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo para amostras coletadas em Campos Sales e resultado negativo nas amostras coletadas no Planalto da Ibiapaba.

Scinax x-signatus (Spix, 1824) (Hylidae): A reprodução segue o padrão mais comum entre os anuros, com a deposição em corpos de água, de ovos que posteriormente eclodem em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou positivo nas amostras coletadas na Chapada do Araripe, Farias Brito e RPPN Monte Alegre e resultado negativo nas amostras coletadas em Campos Sales e Planalto da Ibiapaba. No Brasil, o fungo *Bd* já foi registrado para várias outras espécies do gênero *Scinax* (TOLEDO et al., 2006a; PAULA, 2011; RODRIGUEZ et al. 2014; VALENCIA-AGUILAR et al., 2015; COUTINHO et al., 2015; RUGGERI et al., 2018; RUTHSATZ et al., 2020).

Adenomera juikitam Carvalho e Giaretta, 2013 (Leptodactylidae): espécies deste gênero, ao contrário da grande maioria dos anuros, não usam ambientes aquáticos em nenhuma fase de seu ciclo de vida, depositando ovos em ninhos de espuma, dentro de câmaras escavadas no solo. Os ovos eclodem em girinos endotróficos que geralmente se desenvolvem dentro destas câmaras (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou

resultado positivo nas amostras coletadas na Chapada do Araripe e negativo em Maranguape. No gênero *Adenomera*, o fungo *Bd* já tinha sido registrado para a espécie *A. marmorata* (GRÜNDLER et al. 2012; RODRIGUEZ et al, 2014; COUTINHO et al, 2015).

Leptodactylus fuscus (Schneider, 1799) (Leptodactylidae): coloca seus ovos em ninhos de espuma dentro de câmaras subterrâneas construídas pelos machos. Os ovos eclodem em girinos exotróficos que completam seu desenvolvimento em corpos de água lânticos (KOKUBUM et al., 2009). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo nas amostras coletadas em Campos Sales e Farias Brito e negativo nas amostras coletadas em RPPN Monte Alegre. Becker et al. (2016) também realizou testes com *L. fuscus* e obteve resultado positivo para *Bd* no bioma Amazônia.

Leptodactylus macrosternum Miranda-Ribeiro, 1926 (Leptodactylidae): espécie considerada generalista, ocorrendo em diferentes habitats, tanto secos e abertos como a Caatinga, como florestas tropicais úmidas. São animais resilientes, podendo viver em lugares com modificações no habitat provocadas por perturbações antrópicas, sendo utilizada para consumo humano no Nordeste do Brasil. Sua reprodução ocorre em corpos de água onde depositam seus ovos em ninhos de espuma, eclodindo posteriormente em larvas aquáticas exotróficas (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas em Campos Sales e Farias Brito e negativo em amostras coletadas no Planalto da Ibiapaba e Maranguape. Becker et al. (2016) no Mato Grosso e Amorim et al. (2019) na Bahia registraram indivíduos desta espécie (como *L.chaquensis*) positivos para o *Bd*.

Leptodactylus mystaceus (Spix, 1824) (Leptodactylidae): os machos constroem câmaras subterrâneas no solo, que podem chegar a ter 1 m de profundidade, onde são depositados ovos em ninhos de espuma. Os ovos eclodem em girinos exotróficos que completam seu desenvolvimento em corpos de água lânticos (TOLEDO; CASTANHO; HADDAD, 2005). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas em RPPN Monte Alegre e resultado negativo em amostras coletadas em Maranguape. Becker et al. (2016) também realizou testes com *L. mystaceus* e obteve resultado positivo para *Bd* no bioma Amazônia.

Leptodactylus troglodytes Lutz, 1926 (Leptodactylidae): constroem câmaras subterrâneas no solo onde são depositados ovos em ninhos de espuma. Os ovos eclodem em girinos exotróficos que completam seu desenvolvimento em corpos de água lânticos (KOKUBUM et al., 2009). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em

amostras coletadas Campos Sales e Planalto da Ibiapaba e resultado negativo em amostras coletadas na Chapada do Araripe.

Leptodactylus vastus Lutz, 1930 (Leptodactylidae): conhecida popularmente como rã pimenta. Os machos constroem bacias na vegetação presente nas margens de corpos de água onde o casal em amplexo posteriormente depositará ninhos de espuma com os ovos. Estes eclodem em girinos exotróficos que completam seu desenvolvimento em corpos de água lênticos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas em RPPN Monte Alegre e resultado negativo na Chapada do Araripe e Maranguape.

Physalaemus albifrons (Spix, 1824) (Leptodactylidae): reprodução através de ninhos de espuma na superfície de corpos de água parada. Ovos eclodem em girinos exotróficos. No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas em Campos Sales e resultado negativo em Farias Brito. Amorim et al. (2019) também obteve resultado positivo em *P. albifrons* em espécimes coletados no bioma Caatinga.

Physalaemus cicada Bokermann, 1966 (Leptodactylidae): Espécie encontrada em habitats onde ficam parcialmente submersos, perto da água, ou em vegetações em lagoas temporárias e lênticas, onde depositam seus ovos em ninhos de espuma na superfície da água, com os ovos eclodindo em girinos exotróficos (VIEIRA; ARZABE, 2008). No presente trabalho, esta espécie foi coletada apenas em Campos Sales, tendo apresentado resultado positivo para *Bd*.

Physalaemus cuvieri Fitzinger, 1826 (Leptodactylidae): Espécie que possui reprodução exclusiva na estação chuvosa, quando utiliza ambientes permanentes ou temporários para depositar seus ovos em ninhos de espuma na superfície da água. Os ovos eclodem em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas na Chapada do Araripe, Farias Brito, Monte Alegre e Maranguape e resultado negativo no Planalto da Ibiapaba. O fungo *Bd* já tinha sido registrado para esta espécie, em regiões diversas do Brasil (COUTINHO et al. 2015; RAMALHO 2015; VALENCIA-AGUILAR et al. 2015; PREUSS et al. 2016; AMORIM et al. 2019).

Pseudopaludicola mystacalis (Cope, 1887) (Leptodactylidae): Espécie de pequeno tamanho corporal. Os ovos são depositados em corpos de água parada, eclodindo em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie só foi coletada em Farias Brito, com resultado positivo.

Proceratophrys ararype Mângia, et al., 2018 (Odontophrynidae): espécie recentemente descoberta no planalto da Chapada do Araripe, na ecorregião do nordeste da Caatinga. Por ser endêmica desse brejo de altitude, que se encontra sobre forte pressão de ações antrópicas, esta espécie provavelmente já se encontra ameaçada de extinção (MÂNGIA et al., 2018), a infecção pelo fungo *Bd* descoberta nesse estudo agrava mais ainda a ameaça à existência dessa espécie.

Pithecopus gonzagai Andrade, et al., 2020 (Phyllomedusidae): reprodução arborícola, com os ovos depositados em folhas de plantas acima de corpos de água, após a eclosão, os girinos exotróficos caem no corpo de água onde se desenvolvem (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente trabalho, esta espécie apresentou resultado positivo em amostras coletadas em Campos Sales e resultado negativo no Planalto da Ibiapaba. Valencia-Aguilar et al. (2015) e Ruthsatz et al. (2020) também obtiveram resultados positivos para o *Bd* nesta espécie, em estudos realizados em Alagoas com espécimes coletados no bioma Mata Atlântica.

5.4 Espécies com resultado negativo para o patógeno no estudo

Rhinella granulosa (Spix, 1824) (Bufonidae): se encontra distribuída na região sudeste e nordeste do Brasil, sendo encontrada nos biomas Mata Atlântica e, em especial, na Caatinga (CASSEMIRO; GOUVEIA; DINIZ-FILHO, 2012). Os ovos são depositados diretamente em água parada, eclodindo em girinos exotróficos (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014). No presente estudo, foram analisadas amostras procedentes de quatro localidades, com resultados negativos para *Bd* em todas elas. Benício et al. (2019) registrou indivíduos desta espécie contaminadas por *Bd* em região semiárida do estado do Piauí.

Adelophryne maranguapensis Hoogmoed, Borges & Cascon, 1994 (Eleutherodactylidae): espécie restrita a HFC (floresta úmida em formações cristalinas), endêmica da cadeia de montanhas da Serra de Maranguape (ROBERTO; LOEBMANN, 2016). Possui um modo de reprodução especializado com ovoposição em bromélias e desenvolvimento direto, um fator que torna essa espécie ainda mais vulnerável, devido ao comércio de bromélias, além do desmatamento (ROBERTO; LOEBMANN, 2016). Não existe nenhum registro de *Bd* para espécies de *Adelophryne* no Brasil.

Dendropsophus minusculus (Rivero, 1971) (Hylidae): espécie distribuída na Colômbia, Venezuela, leste de Guiana, e no estado do Pará, e especialmente no nordeste do Brasil (ZINA et al., 2014). Na reprodução, apresentam oviposições aquáticas e terrestres (ZINA

et al., 2014). Ainda que não existe o registro do fungo *Bd* para esta espécie, o mesmo já foi feito para outras espécies do mesmo gênero (PAULA, 2011; BECKER; ZAMUDIO, 2011; RODRIGUEZ et al., 2014; VALENCIA-AGUILAR et al., 2015; PREUSS et al., 2016; RUGGERI et al., 2018; RUTHSATZ et al., 2020).

Trachycephalus typhonius (Linnaeus, 1758) (Hylidae): espécie de ampla distribuição geográfica, incluindo América Central desde o sul do México e América do Sul, ocorrendo em toda bacia da Amazônia, norte da Argentina e Brasil, desde a Amazônia ao Paraná (SOARES; IOP; SANTOS, 2012). Espécie arbórea, bastante ativa a noite, pousando em folhas e ramos durante o dia (DA SILVA et al., 2019). Dentro do gênero *Trachycephalus*, o fungo *Bd* já foi registrado para a espécie *T. mesophaeus* por Rodriguez et al. (2014) e Coutinho et al. (2015).

Pseudopaludicola pocoto Loebmann, Kokubum, Haddad e Garda, 2014 (Leptodactylidae): espécie recentemente descrita com base em material do município de Santa Quitéria, Ceará, Brasil, também encontrada nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, no Nordeste do Brasil, estando particularmente associada ao bioma Caatinga e recentemente descoberta no bioma Mata Atlântica (ANDRADE et al., 2015). Sua reprodução consiste na deposição de ovos em poças de água, que eclodem em girinos exotróficos (MAGALHÃES et al. 2014).

Elachistocleis cesarii (Miranda-Ribeiro, 1920) (Microhylidae): Essa espécie pode ser encontrada nos biomas Caatinga e Cerrado (BENÍCIO et al., 2014). A reprodução ocorre com ovos depositados em água parada, eclodindo em girinos exotróficos (DUBEUX et al. 2020). Espécie diagnosticada com *Bd* em um estudo realizado por Ramalho (2015) com espécimes coletados no bioma Cerrado.

Proceratophrys cristiceps (Müller, 1883) (Odontophrynidae): ocorre no bioma Caatinga e áreas adjacentes no bioma Cerrado a oeste e na Mata Atlântica a leste (MÂNGIA et al., 2020). Os girinos exotróficos dessa espécie podem ser encontrados em poças temporárias (VIEIRA; VIEIRA; SANTANA, 2007).

Proceratophrys renalis (Miranda-Ribeiro, 1920) (Odontophrynidae): foi descrita no município de Itabuna, estado da Bahia, Brasil, ocorrendo em regiões de floresta do estado da Paraíba a Bahia, matas do interior do Brasil, e em áreas de transição entre os biomas Cerrado e Caatinga, em Minas Gerais e Ceará, onde ocorre apenas na Serra de Maranguape e Serra da Aratanha (MÂNGIA; GUIMARÃES; FEIO, 2012; ROBERTO; LOEBMANN, 2016). Sua reprodução ocorre com ovos e girinos exotróficos em água corrente (DUBEUX et al. 2020).

5.5 Técnicas para detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Desde a descoberta da quitridiomiose, várias técnicas de detecção foram descritas e aprimoradas, tendo havido vários progressos que aumentaram sua confiabilidade. O teste de detecção através do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) identifica o *Bd* de forma rápida e com alto grau de sensibilidade e especificidade, combinado a um método de coleta de amostras não invasivo. A escolha do método de detecção do fungo *Bd* varia conforme o objetivo do estudo. Técnicas moleculares, como a PCR convencional, são muito sensíveis, sendo capazes de detectar cargas da infecção baixas. Para o estudo com *Bd*, foi desenvolvido por Annis et al. (2004) primers específicos para detecção, contribuindo bastante na agilidade e precisão do teste. Tem havido grandes avanços em tecnologias moleculares, por exemplo, ensaios com PCR em tempo real. Estes testes são rápidos e mais sensíveis que a PCR convencional, citada anteriormente, e possibilita a quantificação do DNA alvo (BOYLE et al., 2004). No nosso trabalho, validamos o nosso ensaio de PCR através do sequenciamento do produto de PCR de 6 amostras, confirmando que nosso ensaio estava realmente detectando a presença do fungo *Bd*, pois as amostras sequenciadas mostraram maior similaridade com espécies de *Bd* depositadas no GenBank.

Um dos problemas mais consistentes com a técnica de PCR é a inibição da amostra por contaminação do *swab* com solo, detritos e outros componentes presentes na própria epiderme dos anfíbios (HYATT et al., 2007). Os mesmos autores mostram que 25% de seus experimentos de PCR para detecção do fungo *Bd* revelaram inibição completa, podendo haver falsos negativos quando trabalhamos com esse tipo de ensaio. Dentre estas substâncias estão os compostos fenólicos, ácidos tânico e ácidos húmicos (HA), que são citados como os maiores inibidores de PCR e são produzidos a partir da decomposição de materiais vegetais que costumam estar presentes no solo, em sedimentos e em ambientes naturais com água e detritos (GARLAND et al., 2010). Uma forma de contrapor essa inibição é o uso de aditivos na PCR, como albumina sérica bovina (BSA) (WILSON, 1997) que foi usada no presente estudo mostrando-se eficaz.

5.6 Formas de mitigação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Quanto mais precoce for a detecção do fungo *Bd*, mais rápidas medidas de controle de sua propagação podem ser adotadas. Se sua detecção tivesse sido realizada logo quando o patógeno começou a ser disseminado pelo mundo, teria sido possível um tratamento, ou até

mesmo uma cura, como por exemplo, em populações cativas antes da sua liberação no ambiente. Aplicações de formalina em populações cativas demonstraram serem eficazes em adultos *Xenopus tropicalis* (PARKER et al., 2002) e banhos de Itraconazol (0,01%) mostraram serem eficazes no tratamento de espécies terrestres de *Dendrobates tinctorius* (NICHOLS et al., 2001). Também foi sugerido aumento da temperatura de 37° C como tratamento eficaz para *Litoria chloris* (WOODHAMS; ALFORD; MARANTELLI, 2003) em cativeiro. O diagnóstico precoce poderia também permitir o tratamento como proteção para populações ameaçadas, como repovoamento de espécies criadas em cativeiro, monitoramento em locais onde não há relatos anteriormente (BOYLE et al., 2004).

Uma medida eficaz para diminuir a disseminação desse patógeno durante o trabalho de campo é garantir que os protocolos de desinfecção adequados sejam utilizados para mãos, roupas, calçados, equipamentos e veículos usados no campo. O *Bsal*, por exemplo, pode ser morto usando os desinfetantes mais comuns como etanol e água sanitária. Além do mais, criadores de anfíbios devem garantir que animais que estão em cativeiro não sejam libertados no meio ambiente. Deve-se também certificar que resíduos gerados pela limpeza de aquários ou gaiolas, sejam desinfetados e descartados adequadamente (THOMAS et al., 2019).

Assis et al. (2020) realizou um estudo com *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwisd, 1824), onde foi caracterizada a microbiota da pele e realizada uma avaliação quanto às variáveis ambientais e fontes ambientais em relação às comunidades microbianas presentes na pele. O estudo realizou testes em laboratório quanto à capacidade de inibição dessa microbiota em relação ao fungo *Bd*, e teve um resultado significativo, levantando a questão da importância da preservação e manutenção de um ambiente saudável para esses animais, pois essa microbiota está estritamente relacionada ao ambiente em que esses anuros vivem, pois se ele não está em equilíbrio, ocorre, como consequência, a diminuição dessa proteção.

As Unidades de Conservação da Natureza (UCs) são espaços terrestres ou marinhos compostos por atributos naturais e/ou culturais, que apresentam especial importância para a conservação, preservação e o uso sustentável de seus recursos, desenvolvendo um papel extremamente importante para a manutenção da diversidade de seres vivos. Esses locais compõem o patrimônio ambiental e cultural, que pertencem ao país, estados e municípios, pelo fato de apresentarem relevância de interesse ecológico, científico etc., assim como valores culturais integrados a conservação do meio ambiente (FERNANDES, 2011). Nesse trabalho se enquadram como UCs o Parque Nacional de Ubajara localizada na Área de Proteção Ambiental (APA) da Ibiapaba, a Área de Proteção Ambiental (APA) da Serra de Maranguape, A RPPN Monte Alegre localizada na Área de Proteção Ambiental (APA) da Serra de Aratanha, a Área

de Proteção Ambiental (APA) da Serra de Baturité e a Área de Proteção Ambiental (APA) da Chapada do Araripe.

As RPPNs (Reserva Particular do Patrimônio Natural), são uma categoria de Unidade de Conservação e Uso Sustentável, que tem como objetivo básico “compatibilizar a conservação da natureza com o uso sustentável das parcelas dos recursos naturais”, colocando as RPPNs como reserva de uso sustentável (FERNANDES, 2011). Nesse quesito a RPPN Monte Alegre, criada com objetivo essencial de preservação de uma mata onde há uma grande variedade de espécies, favorecendo a nascente de riachos localizados no topo da serra, abrigando uma fauna que apresenta espécies em ameaça de extinção. No entanto, por estar localizada em uma área cercada de habitações humanas infelizmente tem sofrido ameaças e destruição do seu patrimônio (CORDEIRO et al. 2012).

Tendo em vista o perigo e a virulência do fungo *Bd* e sua grande ocorrência no estado do Ceará, que possui uma significativa diversidade de espécies de anfíbios, é urgente que se mobilize esforços para mitigar os riscos, adotando estratégias de monitoramento, e conseqüentemente verificando se já está ocorrendo declínios de animais com intuito de adotar estratégias de conservação.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo mostramos que populações de 20 espécies de anuros no estado do Ceará já se encontram infectadas pelo patógeno *Bd*, em regiões do bioma Caatinga e em locais de brejos de altitude com florestas úmidas, totalizando seis localidades. Nossa análise apontou uma grande proporção de espécies diagnosticadas com a presença do fungo *Bd*, levando a uma preocupação quanto à conservação da biodiversidade no estado. Este trabalho destaca, ainda, a importância de estudos mais profundos sobre a diversidade total de anfíbios no estado, incluindo monitoramento de girinos, que não foi abordado nesse estudo. Os resultados da nossa pesquisa têm relevância tanto para a comunidade científica como para a tomada de decisões acerca da conservação da biodiversidade, principalmente quando a quitridiomiose é apontada como umas das principais causas de declínios e extinções de populações de anfíbios no Brasil e no mundo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-GOMES, M. *et al.* Anurofauna of an Atlantic Rainforest fragment and its surroundings in Northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 70, n. 3 SUPPL., p. 871–877, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. [s.l.], v. 215, 403–410, 1990.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação Da Caatinga: Uma Investigação Ecogeográfica. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 22, n. 3, p. 126–135, 2009.
- ALTWEGG, R.; REYER, H.-U. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. **Evolution; international journal of organic evolution**. [s.l.], v. 57, n. 4, 872–82, 2003.
- AMORIM, F. *et al.* New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the state of Bahia, Brazil: histological analysis in anuran amphibian collections. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 136, n. 2, 147–155, 2019.
- ANDRADE, I. S. *et al.* Distribution extension of *Pseudopaludicola pocoto* Magalhães, Loebmann, Kokubum, Haddad and Garda, 2014 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) in state of Minas Gerais, Brazil. **Herpetology Notes**. [s.l.], v. 8, n. April, p. 227–229, 2015.
- ANNIS, S. L. *et al.* A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. **Journal of Wildlife Diseases**. [s.l.], v. 40, n. 3, 420–428, 2004.
- ASSIS, A. B. *et al.* Environmental influences on and antimicrobial activity of the skin microbiota of *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura) across forest fragments. **Ecology and Evolution**. [s.l.], v. 10, n. 2, 901–913, 2020.
- BAILEY, B. J. Biodiversity: our greatest natural resource. **Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**. [s.l.], v. 120, n. 3, p. 291–5, 1999.
- BECKER, C. G. *et al.* Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. **Ecography**. [s.l.], v. 39, n. 10, 954–960, 2016.
- BECKER, C. G.; ZAMUDIO, K. R. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 108, n. 24, p. 9893–9898, jun. 2011.
- BENÍCIO, R. A. *et al.* Comunidade de anuros em uma área de ecótono no nordeste do Brasil. **Community of anurans in an ecotonal area in northeastern Brazil**. Belém, v. 9, n. 3, p. 511–517, 2014.
- BENÍCIO, R. A. *et al.* Worrying News for Brazilian Caatinga: Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians. **Tropical Conservation Science**. [s.l.], v. 12, p. 1–6, 2019.

BERGER, L. *et al.* Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 95, n. 15, 9031–9036, 1998.

BERGER, L.; SPEARE R.; HYATT, A. **Chytrid fungus and amphibian declines: Overview, implications and future directions**. In: Campbell A, editor. Declines and disappearances of Australian frogs. Canberra: Environment Australia. pp. 23–33, 1999.

BOYLE, D. *et al.* Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 60, 141–148, 2004.

BRITO-GITIRANA, L. *et al.* Is the Chytrid Fungus Really Responsible for Amphibian Decline? **The Open Zoology Journal**. Ilha do Fundão - Cidade Universitária, v. 2, 49–52, 2009.

BURROWES, P. A.; DE LA RIVA, I. Detection of the Amphibian Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Museum Specimens of Andean Aquatic Birds: Implications for Pathogen Dispersal. **Journal of Wildlife Diseases**. [s.l.], v. 53, n. 2, 349–355, 2017.

CARNAVAL, A. C. O. Q. *et al.* Chytrid fungus infects high altitude stream dwelling Hylodes magalhaes (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. **Froglog**. [s.l.], v. 70, 3–4, 2005.

CARNAVAL, A. C. O. Q. *et al.* Amphibian Chytrid Fungus Broadly Distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **EcoHealth**. [s.l.], v. 3, n. 1, 41–48, 2006.

CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. [s.l.], v. 284, n. 1848, 20162254, 2017.

CASCON, P.; BRITO, I.; ROBERTO, I. J. Anfíbios in BOTERO, J. I. S. ; GARCEZ, D. S. ; CASCON, P.; LIMA, S. M. Q. ; BRITO, L. ; ROBERTO, I. J. **Anfíbios e peixes do Parque Nacional de Ubajara e entorno. Guia ilustrado**. 1a ed. Fortaleza: UFC/LABOMAR/NAVE, 2014. v. 01. 128p.

CASSEMIRO, F. A. S.; GOUVEIA, S. F.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Distribuição de *Rhinella granulosa*: integrando envelopes bioclimáticos e respostas ecofisiológicas. **Revista da Biologia**. São Paulo, v. 8, n. June 2014, 38–44, 2012.

CAVALCANTI, L. DE H.; PUTZKE, J. Myxomycetes da Chapada do Araripe (Crato - CE, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, DF, v. 12, n. 3, 253–261, 1998.

CECCON, E. S. **Fatores abióticos relacionados à incidência e prevalência do fungo quitrídio na rã-das-corredeiras *Limnomedusa macroglossa***. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2019.

CHENG, T. L. *et al.* Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the

emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 108, n. 23, 9502–9507, 2011.

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**. [s.l.], v. 9, n. 2, p. 89–98, 2003.

CORDEIRO, A. C. L. *et al.* **Plano de Manejo da Reserva Particular do Patrimônio Natural Monte Alegre, Município de Pacatuba, Estado do Ceará**. ASA BRANCA (Associação dos proprietários de RPPNs do Estado do Ceará). 133 pp, 2012.

COSTANZA, R. *et al.* The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**. Estocolmo, v. 387(6630), 253–260, 1997.

COUTINHO, S. D. *et al.* The use of singleplex and nested PCR to detect *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-living frogs. **Brazilian Journal of Microbiology**. [s.l.], v. 46, n. 2, 551–555, 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. [s.l.], v. 1830, n. 6, 3670–3695, 2013.

DA SILVA, I. C. O. *et al.* A case of Dipteran parasitism in *Trachycephalus typhonius* (Anura: Hylidae), with a summary of myiasis parasitism in anurans. **Phyllomedusa**. [s.l.], v. 18, n. 2, p. 283–292, 2019.

DUBEUX, M. J. M. *et al.* Morphological characterization and taxonomic key of tadpoles (Amphibia: Anura) from the northern region of the Atlantic Forest. **Biota Neotropica**. [s.l.], v. 20 (2: e20180718): 1–24, 2020.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. 2.ed. Baltimore and London: McGraw-Hill, 1994. 670 p.

ETEROVICK, P. C. *et al.* Amphibian declines in Brazil: An overview. **Biotropica**. [s.l.], v. 37, n. 2, p. 166–179, 2005.

FERNANDES, M. F. **Ações de apoio à gestão das Unidades de Conservação e o Programa RPPN Paulistas da Fundação Florestal**. Relatório de estágio de instrumentação na área da Biologia da Conservação, Botucatu – SP, 2011.

FERREIRA, A.; CLAUDIO, M.; ÁVILA, R. W. Herpetofauna da Bacia Hidrográfica do Rio Salgado, Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**. [s.l.], v. 40, n. May 2014, p. 23–48, 2018.

FERREIRA, T. K. *et al.* Amphibian Chytrid Infection in *Melanophryniscus moreirae* (Bufonidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Herpetological Review**. [s.l.], v. 39, n. 4, 445–446, 2008.

FISHER, M.C., GARNER, T.W.J. Chytrid fungi and global amphibian declines. **Nature Reviews Microbiology**. [s.l.], v. 18, 332–343, 2020.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. **Annual Review of Microbiology**. [s.l.], v. 63, n. 1, 291–310, 2009.

FRANCISCO, P. R. M. **Modelo de mapeamento da deterioração do Bioma Caatinga da Bacia Hidrográfica do Rio Taperoá, PB**. 2013. 113f. (Tese de Doutorado em Engenharia Agrícola), Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Centro de Tecnologias e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande – Paraíba – Brasil, 2013.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.1 (Date of access). Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Acesso em: 29 jan. 2021.

GARDA, A.A., STEIN, M.G., MACHADO, R.B., LION, M.B., JUNCÁ, F.A., NAPOLI M.F. Ecology, Biogeography and Conservation of Amphibians in the Semiarid Brazilian Caatinga. In: Silva, J.M.C., Leal, I., Tabarelli, M. (eds) Biodiversity, Ecosystems Services and Sustainable Development in Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. **Springer-Verlag**. [s.l.], pp. 1–18, 2017.

GARLAND, S. *et al.* BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 92, n. 2–3, 113–116, 2010.

GARMYN, A. *et al.* Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PLoS ONE**. [s.l.], v. 7, n. 4, p. e35038, 2012.

GARNER, T. W. *et al.* The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biology Letters**. [s.l.], v. 2, n. 3, 455–459, 2006.

GODINHO, L. B.; MOURA, M. R.; FEIO, R. N. New records and geographic distribution of *Corythomantis greeningi* Boulenger, 1896 (Amphibia: Hylidae). **Check List**. [s.l.], v. 9, n. 1, 148–150, 2013.

GOKA, K. *et al.* Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. **Molecular Ecology**. [s.l.], v. 18, n. 23, 4757–4774, 2009.

GRÜNDLER, M. *et al.* Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 97, n. 3, 173–184, 2012.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. de A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**. [s.l.], v. 55, n. 3, 207, 2005.

HOCKING, D.; BABBITT, K. Amphibian contributions to ecosystem services. **Herpetological Conservation and Biology**. [s.l.], v. 9, 1–17, 2014.

HYATT, A. *et al.* Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 73, 175–192, 2007.

IUCN, **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2020-3, 2021. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 29 jan. 2021.

JAMES, T. Y. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**. [s.l.], v. 443, n. 7113, p. 818–822, 2006.

JAMES, T. Y. *et al.* Rapid Global Expansion of the Fungal Disease Chytridiomycosis into Declining and Healthy Amphibian Populations. **PLoS Pathogens**. San Francisco, v. 5, p. e1000458, 2009.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Water: Quarantine and Disease Control Implications. **Emerging Infectious Diseases**. Townsville, v. 9, n. 8, p. 915–921, ago. 2003.

KOKUBUM, M. N. C. *et al.* Reproductive biology of the Brazilian sibilator frog *Leptodactylus troglodytes*. **Herpetological Journal**. Goiânia, v. 19, n. 3, p. 119–126, 2009.

KOLBY, J. E. *et al.* Terrestrial Dispersal and Potential Environmental Transmission of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). **PLOS ONE**. [s.l.], v. 10, n. 4, p. e0125386, abr. 2015.

KOSCH, T. A.; SUMMERS, K. Techniques for minimizing the effects of PCR inhibitors in the chytridiomycosis assay. **Molecular Ecology Resources**. [s.l.], v. 13, n. 2, p. 230–236, 2013.

LAMBERTINI, C., RODRIGUEZ, D., BRITTO, F. B., LEITE, D. E., TOLEDO, L. F. Diagnostico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetologia Brasileira**. [s.l.], v. 2, 12e17, 2013.

LIPS, K. R. *et al.* From The Cover: Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 103, n. 9, p. 3165–3170, 2006.

LISBOA, B. S. *et al.* New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the atlantic forest of Northeastern Brazil. **North-Western Journal of Zoology**. Oradea, v. 9, n. 1, p. 210–213, 2013.

LOEBMANN, D.; ROBERTO, I. J.; LOEBMANN, D. Composition , distribution patterns , and conservation priority areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Salamandra**. Mannheim, v. 52, n. 2, p. 134–152, 2016.

LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual review of biochemistry**. [s.l.], v. 49, p. 727–764, 1980.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. **Mycologia**. Lawrence, v. 91, n. 2, p. 219, mar. 1999.

MAGALHÃES, F.M., LOEBMANN, D., KOKUBUM, M.N.C., HADDAD, C.F.B., GARDA,

- A.A. A new species of *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from northeastern Brazil. **Herpetologica**. [s.l.], v. 70, 77–88, 2014.
- MAIA, J. M. *et al.* Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. [s.l.], v. 41, p. 295–310, 2017.
- MÂNGIA, S. *et al.* A New Species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the Araripe Plateau, Ceará State, Northeastern Brazil. **Herpetologica**. [s.l.], v. 74, n. 3, p. 255–268, 2018.
- MÂNGIA, S., C. DA S. GUIMARÃES, R. N. FEIO. Distribution extension and geographic distribution map of *Proceratophrys renalis* (Miranda-Ribeiro, 1920) (Anura, Odontophrynidae). Check List. **Journal of Species Lists and Distribution**. [s.l.], v. 8, 298–299, 2012.
- MÂNGIA, S., E. F. DE OLIVEIRA, D. J. SANTANA, R. KOROIVA, F. PAIVA, AND A. A. GARDA. Revising the taxonomy of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Odontophrynidae) from the Brazilian semiarid Caatinga: Morphology, calls and molecules support a single widespread species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. [s.l.], 58: 1151–1172, 2020.
- MARTEL, A. *et al.* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 110, n. 38, p. 15325–15329, 2013.
- MCMAHON, T. A. *et al.* Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 110, n. 1, p. 210–215, jan. 2013.
- MESQUITA, A.F.C., LAMBERTINI, C., LYRA, M. *et al.* Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. **Scientific Reports**. [s.l.], v. 7, 16605, 2017.
- MITTERMEIER, R. A., TURNER, W. R., LARSEN, F. W. *et al.* Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In: Biodiversity Hotspots. **Springer Berlin Heidelberg**. Berlin, Heidelberg, pp 3–22, 2011.
- MYERS, N. Threatened biotas: “Hot spots” in tropical forests. **Environmentalist**. Headington, v. 8, 187–208, 1988.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. [s.l.], v. 403, 853–858, 2000.
- NICHOLS, D. K. *et al.* Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. **Journal of Wildlife Diseases**. [s.l.], v. 37, n. 1, p. 1–11, 2001.
- OZA, G. M. Ecological effects of the frog’s legs trade. **The Environmentalist**. [s.l.], v. 10, n. 1, p. 39–42, mar. 1990.
- PARKER, J. M. *et al.* Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). **Comparative medicine**. [s.l.], v. 52, n. 3, p. 265–

8, 2002.

PAULA, C. D. DE. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo.** São Paulo: Universidade de São Paulo, ago. 2011.

PESSIER, A. P. *et al.* Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates spp.*) and White's Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** [s.l.], v. 11, n. 2, p. 194–199, 1999.

PONTES, M., AUGUSTO-ALVES, G., LAMBERTINI, C., & TOLEDO, L. A lizard acting as carrier of the amphibian-killing chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in southern Brazil. **Acta Herpetologica.** [s.l.], 13(2), 201-205, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-23582. Acesso em: 24 jan. 2020.

POUNDS J.A., BUSTAMANTE M.R., COLOMA L.A. *et al.* Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature.** [s.l.], v. 439, 161–167, 2006.

PREUSS, J. F. *et al.* *Batrachochytrium dendrobatidis* in near threatened and endangered amphibians in the southern Brazilian Atlantic Forest. **North-Western Journal of Zoology.** Oradea, v. 11, n. 2, p. 360–362, 2015.

PREUSS, J. F. *et al.* Crossing the threshold: an amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. **Studies on Neotropical Fauna and Environment.** Oradea, v. 51, n. 1, p. 68–77, 2016.

QUEIROZ, M. A. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física.** [s.l.], 6, 1135-1150, 2011.

RACHOWICZ, L. J. *et al.* The Novel and Endemic Pathogen Hypotheses: Competing Explanations for the Origin of Emerging Infectious Diseases of Wildlife. **Conservation Biology.** El Portal, v. 19, n. 5, p. 1441–1448, out. 2005.

RAGHAVENDRA, K.; SHARMA, P.; DASH, A. P. Biological control of mosquito populations through frogs: opportunities & constrains. **The Indian journal of medical research.** Delhi, v. 128, n. 1, p. 22–5, jul. 2008.

RAMALHO, A. C. DE O. *et al.* First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two endemic Cerrado hylids, *Bokermannohyla pseudopseudis* and *Bokermannohyla sapiranga*, with comments on chytridiomycosis spreading in Brazil. **North-Western Journal of Zoology.** Oradea, v. 9, n. 1, p. 145–150, 2013.

RAMALHO, A. C. DE O. **Correlatos ecológicos da quitridiomycose em anuros do Cerrado.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2015.

ROBERTO, I. J.; LOEBMANN, D. Composition, distribution patterns, and conservation priority areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Salamandra.** Mannheim, v. 52, n. 2, p. 134–152, 2016.

- RODRIGUEZ, D. *et al.* Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. **Molecular Ecology**. [s.l.], v. 23, n. 4, p. 774–787, 2014.
- ROSENBLUM, E. B. *et al.* Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s.l.], v. 110, n. 23, p. 9385–9390, 2013.
- ROSSA-FERES, D. DE C. *et al.* Anfíbios do Estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e perspectivas. **Biota Neotropica**. [s.l.], v. 11, n. suppl 1, p. 47–66, dez. 2011.
- RUGGERI, J. *et al.* Seasonal Variation in Population Abundance and Chytrid Infection in Stream-Dwelling Frogs of the Brazilian Atlantic Forest. **PLOS ONE**. [s.l.], v. 10, n. 7, p. e0130554, jul. 2015.
- RUGGERI, J. *et al.* Amphibian chytrid infection is influenced by rainfall seasonality and water availability. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 127, n. 2, p. 107–115, jan. 2018.
- RUTHSATZ, K. *et al.* Skin microbiome correlates with bioclimate and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection intensity in Brazil's Atlantic Forest treefrogs. **Scientific Reports**. [s.l.], v. 10, n. 1, p. 22311, 2020.
- SCHEELE, B. C. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**. [s.l.], v. 363, n. 6434, p. 1459–1463, 2019.
- SCHLOEGEL, L. M. *et al.* Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**. [s.l.], v. 21, n. 21, p. 5162–5177, nov. 2012.
- SEGALLA, M. V. *et al.* Brazilian Amphibians: list of species. **Herpetologia Brasileira**. [s.l.], v 1, 2019.
- STUART, S. N. *et al.* Status and trends of amphibian. **Science**. [s.l.], v. 306, n. 5702, p. 1783–1786, 2004.
- SHUMAN-GOODIER, M. E., DIAZ, M. I., ALMAZAN, M. L., *et al.* Ecosystem hero and villain: Native frog consumes rice pests, while the invasive cane toad feasts on beneficial arthropods. **Agric Ecosyst Environ**. [s.l.], 279:100–108, 2019.
- SILVANO, D.; BORGES-NOJOSA, D. 2004. *Adelophryne maranguapensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: T56302A11452757. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T56302A11452757.en>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- SILVANO D.L., SEGALLA M.V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**. [s.l.], v. 1, 79-86, 2005.
- SOARES, M. D. L.; IOP, S.; SANTOS, T. G. DOS. Expansion of the geographical distribution of *Trachycephalus typhonius* (Linnaeus, 1758) (Anura: Hylidae): first record for the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List**. [s.l.], v. 8, n. 4, p. 817, 2012.

THOMAS, V. *et al.* Mitigating *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. **Amphibia Reptilia**. [s.l.], v. 40, n. 3, p. 265–290, 2019.

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**. [s.l.], v. 1, n. 3, p. 185–191, 2006a.

TOLEDO, L. F. *et al.* A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. **Amphibian and Reptile Conservation**. [s.l.], v. 4, n. 1, p. 17–21, 2006b.

TOLEDO, L. F.; CASTANHO, L. M.; HADDAD, C. F. B. Recognition and distribution of *Leptodactylus mystaceus* (Anura; Leptodactylidae) in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**. [s.l.], v. 5, n. 1, p. 57–62, 2005.

VALENCIA-AGUILAR, A. *et al.* Chytrid fungus acts as a generalist pathogen infecting species-rich amphibian families in Brazilian rainforests. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 114, n. 1, p. 65–77, 2015.

VIEIRA, C. *et al.* Body length of *Hylodes* cf. *ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 73, n. 1, p. 195–199, 2013.

VIEIRA, C. A. *et al.* First Record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Paraná, Brazil. **Herpetological Review**. [s.l.], v. 43, n. 1, p. 93–94, 2012.

VIEIRA, W. L. D. S.; ARZABE, C. Descrição do girino de *Physalaemus cicada* (Anura, Leiuperidae). **Iheringia - Serie Zoologia**. Porto Alegre, v. 98, n. 2, p. 266–269, 2008.

VIEIRA, W. L. S.; VIEIRA, K. S.; SANTANA, G. G. Description of the tadpoles of *Proceratophrys cristiceps* (Anura: Cycloramphidae, Odontophrynini). **Zootaxa**. [s.l.], n. 1397, p. 17–24, 2007.

VOYLES, J. *et al.* Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**. [s.l.], v. 326, n. 5952, p. 582–585, 2009.

VREDENBURG, V. T. *et al.* Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* Collected in Africa (1871–2000) and in California (2001–2010). **PLoS ONE**. [s.l.], v. 8, n. 5, p. e63791, 2013.

WELDON, C. *et al.* Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. **Emerging Infectious Diseases**. Townsville, v. 10, n. 12, p. 2100–2105, dez. 2004.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**. Belfast, v. 63, n. 10, p. 3741–3751, 1997.

WOODHAMS, D. C.; ALFORD, R. A.; MARANTELLI, G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. **Diseases of Aquatic Organisms**. [s.l.], v. 55, n. 1, p. 65–67, 2003.

ZINA, J. *et al.* The recognition of *Dendropsophus minusculus* (Rivero, 1971) (Hylidae, Dendropsophini) as a highly polymorphic, multi-domain distributed species. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 74, n. 3, p. 146–153, 2014.

ZIPKIN, E. F., DIRENZO, G. V., RAY J. M., *et al.* Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. **Science**. [*s.l.*], v. 367:814–816, 2020.