



CAROLINA LAMBERTINI

VARIAÇÃO FENOTÍPICA DE *Batrachochytrium dendrobatidis* COMO PREDITORA  
DE INFECÇÃO EM ANUROS DA MATA ATLÂNTICA

CAMPINAS,

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**CAROLINA LAMBERTINI**

**“VARIÇÃO FENOTÍPICA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*  
COMO PREDITORA DE INFECÇÃO EM ANUROS DA MATA  
ATLÂNTICA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da Dissertação defendida pela candidata

***Carolina Lambertini***

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para obtenção do  
Título de MESTRA em Biologia Animal, na  
área de Biodiversidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Felipe Toledo Ramos Pereira

**CAMPINAS  
2014**

L176v Lambertini, Carolina, 1987-  
Variação fenotípica de *Batrachochytrium dendrobatidis* como preditora de infecção em anuros da Mata Atlântica / Carolina Lambertini. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Quitridiomycose. 2. Anfíbio - Infecções. 3. Variação fenotípica. 4. Epidemiologia. 5. Declínio de anfíbios. I. Toledo, Luís Felipe. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics

**Palavras-chave em inglês:**

Chytridiomycosis

Amphibians - Infections

Phenotypic variation

Epidemiology

Amphibian declines

**Área de concentração:** Biodiversidade Animal

**Titulação:** Mestra em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira [Orientador]

Cláudia Maris Ferreira Mostério

Elaine Maria Lucas Gonsales

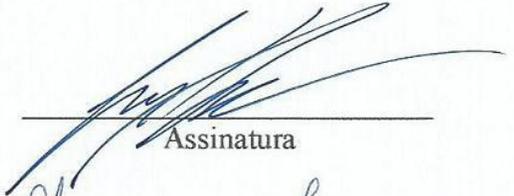
**Data de defesa:** 12-08-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

Campinas, 12 de Agosto de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

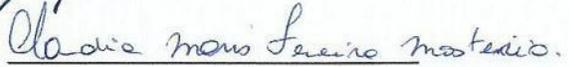
Prof. Dr. Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira (orientador)



---

Assinatura

Prof. Dra. Cláudia Maria Ferreira Mostério



---

Assinatura

Prof. Dra. Elaine Maria Lucas Gonsales



---

Assinatura

Prof. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço

---

Assinatura

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

---

Assinatura



## RESUMO

Os anfíbios são os animais mais ameaçados do planeta, tendo como fatores mais impactantes a perda de habitat e a quitridiomíose. Esta doença em anuros é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), que já foi registrado em todos os continentes e no Brasil estende-se por toda a Mata Atlântica, e já foi encontrado no Cerrado e na Amazônia. Existem diversos fatores que podem influenciar a dinâmica de infecção na natureza, e como fatores intrínsecos ao *Bd* podemos citar a variação genotípica, morfológica, variação na virulência e taxas de crescimento. Com isso, o presente estudo teve como objetivos caracterizar genotípica e fenotipicamente cepas de *Bd* provenientes de um gradiente de elevação na Mata Atlântica, e verificar se existem associações entre o tamanho dos zoósporos e zoosporângios das cepas isoladas com dados de prevalência e intensidade de infecção e taxa de crescimento do *Bd*. Adicionalmente, foi analisado se as taxas de infecção aumentam conforme o aumento da elevação. Para tanto, foram isoladas e genotipadas cinco cepas de *Bd*. Foi realizado o diagnóstico e quantificação da doença, assim como a confecção de suas curvas de crescimento. Com base nos resultados foram desenvolvidos dois índices relacionados à variação em tamanho e dados de prevalência e intensidade de infecção. Todas as cepas isoladas pertencem à linhagem *Bd*-GPL2. Foi detectada variação fenotípica entre as cepas e associações entre tamanho das cepas com prevalência e intensidade de infecção, e não houve associação com as taxas de crescimento. A prevalência e intensidade de infecção não aumentaram com a altitude. Os índices de tamanho e infecção também foram associados. Com isso, a variação fenotípica pode ser considerada preditora da dinâmica de infecção do *Bd* na natureza. Isto poderá ser utilizado como eficiente ferramenta de baixo custo para estudos que busquem reconhecer áreas nas quais o fungo pode ser mais prevalente e apresentar maior intensidade de infecção. Estes fatores podem ser cruciais para determinar populações de anfíbios ameaçadas.

Palavras-chave: Quitridiomíose, morfologia, patogenicidade, epidemiologia, conservação.



## ABSTRACT

Amphibians are the most threatened animals of the world. Habitat loss and chytridiomycosis are considered the main causes for their declines. Chytridiomycosis is a disease caused in anurans by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), detected worldwide. In Brazil it was registered all over the Atlantic rainforest and in some localities of the Cerrado and Amazonia. Several factors influence this disease dynamics, such as intrinsic factors related to *Bd*: different lineages, morphology, virulence, and growth rate. Given these factors, the present study aimed to genotype and analyze *Bd* strain's size from an elevational range, and verify if these factors were correlated to *Bd* size, prevalence, infection load, growth rate, and elevation. We isolated and genotyped five strains, and quantified growth rates. We developed two indexes related to *Bd* size, prevalence, and infection load. The five strains were *Bd*-GPL2. We found size variation and correlations between *Bd* size, prevalence, and infection load, but not with growth rate. Prevalence and infection load did not increase with elevation. The size and infection indexes were correlated. The phenotypic variation can be considered as a predictor to disease dynamics on environment. It can be used in other studies as a tool to efficiently (cheap and fast) identify areas where the fungus can develop faster and be more deleterious to amphibian populations.

Keywords: Chytridiomycosis, morphology, pathogenicity, epidemiology, conservation.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
Lista de ilustrações .....	xix
Lista de tabelas .....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	14
ARTIGO .....	25
Abstract .....	25
Introduction .....	26
Methods .....	28
Results .....	32
Discussion .....	33
Acknowledgements .....	36
References .....	37
Table 1 .....	45
Figure legends .....	46

Figures .....	47
Appendix .....	53
SÍNTESE GERAL .....	57
ANEXO .....	60

**Este trabalho é totalmente dedicado à minha família e meus amigos, pelo incentivo e confiança em mim depositados durante os anos que venho me dedicando à carreira científica.**



## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNICAMP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento deste trabalho através da concessão da bolsa de estudos (Processo nº 2012/04160-0).

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Felipe Toledo, a quem eu me espelho para seguir minha carreira profissional, por toda ajuda e dedicação, pela confiança e oportunidades muitas que colocou em meu caminho. Por me mostrar o que é a carreira acadêmica, e contribuir para o amor e dedicação que tenho para seguir em frente.

Ao meu co-orientador e pai científico Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, a quem eu considero o grande responsável pelo início da minha carreira profissional, por ter aberto as portas do seu laboratório, me dando a oportunidade de aprender e crescer, e encontrar meu caminho. Pela amizade, preocupação e confiança.

Aos membros da banca pela disponibilidade e grande ajuda.

Ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e ao Instituto Florestal pela concessão das autorizações necessárias para a elaboração do presente trabalho.

Aos colaboradores e amigos da Universidade de Michigan: Prof. Dr. Timothy Y. James, Thommas S. Jenkinson, Clarisse Marie Bettancourt-Roman, Anat Belasen e Sally Carson por tudo que me ensinaram.

Aos meus pais, Nuno Lambertini Júnior e Marlene Soares Lambertini, por serem os grandes responsáveis pelo início da minha carreira. Quando nos momentos mais difíceis que passamos, acreditaram e fizeram o impossível para me ajudar a seguir. Ao amor mais verdadeiro que se pode sentir, e que me transmitem todos os dias, eternamente.

À minha família: Bruno Lambertini, Fernanda Lambertini Piva, Keylla Mara Campos Lambertini, Adailton Renato Piva, Pedro Campos Lambertini, Nuno Lambertini,

Divina Felício de Souza Lambertini, Antônio Carlos Lambertini, Expedita Soares Cabral, que desde o início me apoiaram de todas as formas, sempre com muito amor, carinho e confiança.

Ao Alexandre Missassi, por me ajudar a recuperar o sentido de seguir em frente, com todo seu amor e companheirismo, trazendo de volta meu fôlego, luz e paz à minha vida. A quem eu dedico meus sorrisos mais sinceros e um amor imenso.

Aos meus amigos de longa data: Anita Presotto, Bruno Perozzo, Carolina Marcucci, Carlão Ferreira Junior, Danielle Barreto, Fernanda Oliveira, Henrique e Julio Pazzeti, Igor Monteiro, Josy Corol, Karine Roggato, Lucas Beraldo, Marjori Laporte, Thiago Henrique Leone, Vinicius Julião e Vitor Roman pela parceria eterna.

A toda família Bernal Moleiro, por durante muitos anos terem feito parte da minha vida, por todo o incentivo e confiança em mim depositados, e pelos diversos momentos felizes que passamos juntos.

Às minhas riquezas Amanda K. Siqueira, Ana Beatriz Carollo, Carlos Henrique L. N. Almeida, Luiz Fernando M. de Lima, Milena Corbo, Paula Morão, Tamilie Carvalho, e meus parceiros e amigos do laboratório e fonoteca da UNICAMP, os quais considero como minha família científica: Amanda Piffer, Camila Zornosa Torres, Cláudia Moura, Conrado Augusto Vieira, Daniel M. Mendes, Diogo Moraes, Giulia D'Angelo, Ivan Neri Cardoso, Leandro Taccioli, Marjorie Cataneo Fernandes, Meghi Nogueira, Michel de Aguiar Passos, Mirtis Maria Giaciani Ferraz, Prof. Dr. Ivan Sazima e Lucas Forti por toda ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis e nos melhores também.

Aos amigos que fiz com parcerias em trabalhos: Ana C. Ramalho, Anyelet V. Aguiar, E. Gustavo Ruano, Jackson F. Preuss, Joice Ruggeri, Raquel F. Salla, Ricardo Lourenço de Moraes e Prof. Tamí Mott.

“And what is there to life if a man cannot hear the lonely cry of a whippoorwill or the arguments of the frogs around the pond at night?”

CHIEF SEATTLE, 1854



## Lista de ilustrações

- Figura 1.** Associação entre o tamanho médio dos zoósporos e zoosporângios das cinco cepas de *Batrachochytrium dendrobatidis* isoladas de um gradiente de elevação localizado na Mata Atlântica..... 47
- Figura 2.** Associação entre variáveis morfológicas e epidemiológicas: tamanho médio dos zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis* e média da intensidade de infecção (A), tamanho médio dos zoosporângios e média da intensidade de infecção (B), tamanho médio dos zoósporos e prevalência (C) e tamanho médio dos zoosporângios e prevalência (D)..... 48
- Figura 3.** Esquema representativo de todas as variáveis analisadas: Tamanho médio dos zoósporos, tamanho médio dos zoosporângios, prevalência, média da intensidade de infecção, taxa de crescimento no último dia (dia 9) e elevação. As linhas pretas representam as associações significativas..... 49
- Figura 4.** Curvas de crescimento das cinco cepas de *Batrachochytrium dendrobatidis*, medidas em quadruplicata, através do número de zoósporos liberados em cultura, mantidas à temperatura constante de inoculação..... 50
- Figura 5.** Associação entre índice de tamanho e índice de infecção, com a equação desenvolvida utilizando ambos os índices..... 51

**Figura S1.** Prevalência (A) e intensidade de infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* (B) em relação ao gradiente de elevação..... 52

**Figura S2.** Variação no tamanho médio dos zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis* (A) e tamanho médio dos zoosporângios (B) em relação ao gradiente de elevação. As letras representam as diferenças entre as cepas..... 53

**Figura S3.** Regressão linear entre os dados de prevalência e intensidade de infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* provenientes do gradiente de elevação, mostrando uma tendência..... 54

**Figure S4.** Associações entre todas as variáveis analisadas: tamanho médio dos zoósporos e dos zoosporângios, prevalência, média da intensidade de infecção, número médio de zoósporos no último dia da curva de crescimento (dia 9) e a relação entre todas as variáveis com elevação. \*Representam relações significativas..... 55

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Dados referentes ao gradiente de elevação e respectivas cepas de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> isoladas, tamanho médio dos zoósporos e zoosporângios com desvio padrão acima dos valores mínimo e máximo, prevalência, média da intensidade de infecção com desvio padrão acima dos valores mínimo e máximo, e número de zoósporos no último dia (dia 9) da curva de crescimento. Os hospedeiros foram girinos da espécie <i>Hylodes phyllodes</i> , e as cepas foram classificadas como linhagem <i>Bd-GPL2</i> .....	45
---	----



## INTRODUÇÃO GERAL

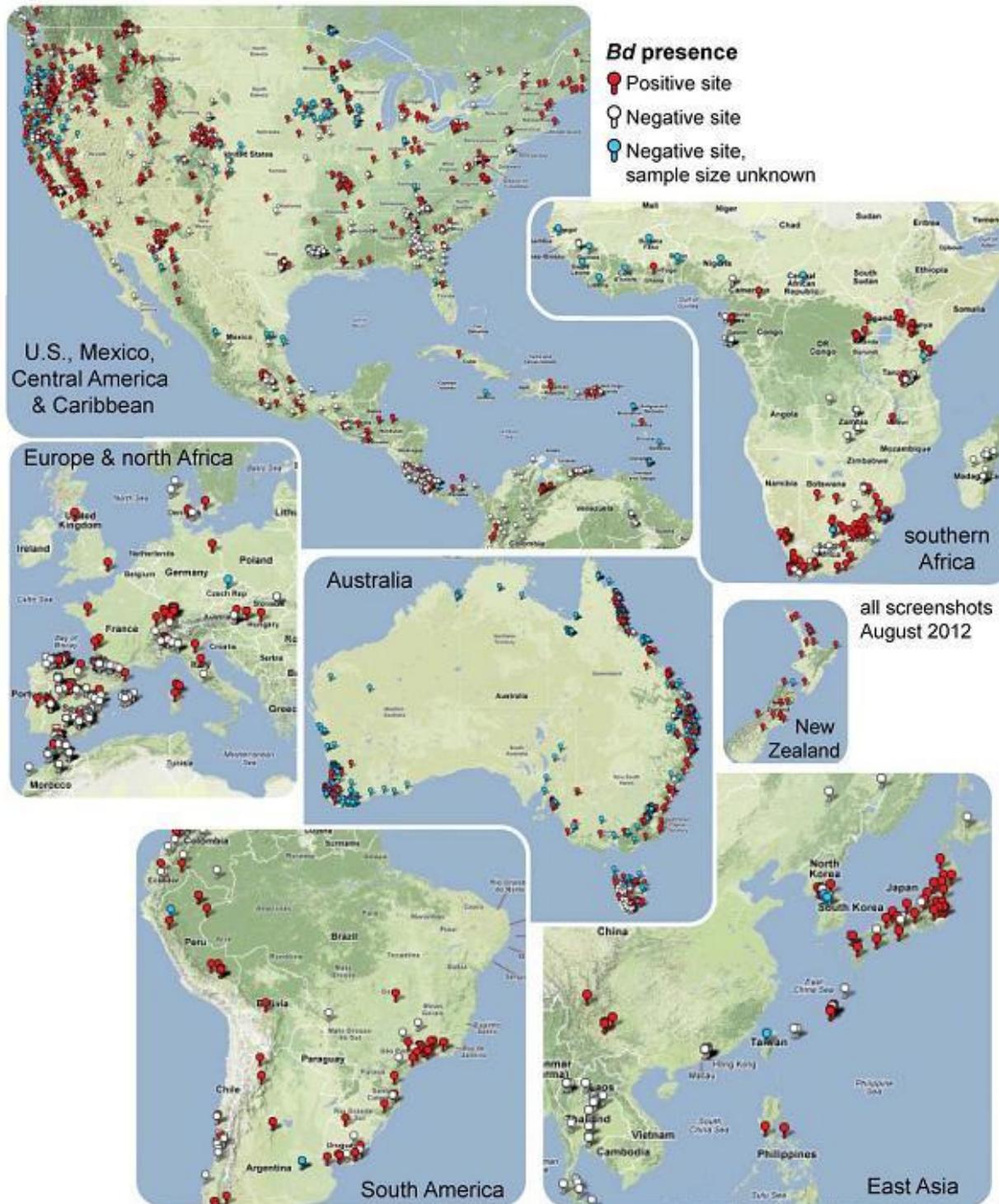
Segundo dados da *Global Amphibian Assessment*, mais de 30% das espécies de anfíbios que compõem a biodiversidade mundial estão classificadas como ameaçadas ou extintas, com mamíferos e aves ocupando respectivamente o segundo e terceiro lugares em termos de ameaças (Stuart *et al.* 2004). Com isso, os anfíbios são considerados atualmente como a classe de vertebrados mais ameaçada do planeta (Kilpatrick *et al.* 2009). Diversos estudos vêm sendo realizados no intuito de investigar as reais causas do declínio mundial de populações de anfíbios e, dentro dos diversos fatores conhecidos como responsáveis pelos declínios, a fragmentação e perda de habitat até então foi considerada como fator de maior impacto e, juntamente com a exploração crescente de diversos ambientes, foi considerada como ameaça primária para a fauna mundial (Kriger & Hero 2008).

Podemos citar outros fatores que influenciam o declínio dos anfíbios como as mudanças climáticas, que podem ser consideradas direta ou indiretamente responsáveis e podem favorecer a emergência de novas doenças (Pounds *et al.* 2006). Outros fatores conhecidos são: poluição ambiental, introdução de predadores e competidores (Daszak *et al.* 1999), contaminações químicas, comercialização de espécies, aumento na incidência de radiação UV (Semlitsch 2003, McMenamin *et al.* 2008, Mann *et al.* 2009) e a disseminação de doenças (Daszak *et al.* 1999, Daszak *et al.* 2003, Toledo 2009).

Diversas doenças são conhecidas por afetarem anfíbios e são causadas por uma diversidade de patógenos como: vírus, bactérias, tremátodos e fungos (Carey 1993, Johnson *et al.* 1999, Kiesecker *et al.* 2001). Porém, uma doença em específico vem causando grande impacto em populações de anfíbios em todo o mundo: a quitridiomiose (Berger *et al.*

1998, Berger *et al.* 1999, Daszak *et al.* 1999). Diante do crescente número de estudos realizados sobre a quitridiomycose e seu impacto nos anfíbios, essa doença e a fragmentação de habitat são atualmente considerados como principais responsáveis pelo declínio mundial das populações de anfíbios (Becker *et al.* 2007, Skerratt *et al.* 2007).

A quitridiomycose é uma doença infecciosa emergente, que por definição representa uma doença que é ou recentemente aumentou em incidência, impacto, patogenicidade, distribuição geográfica e número de hospedeiros (Daszak *et al.* 2003). Esta doença é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.* 1999), também chamado de *Bd*, que pertence ao filo Chytridiomycota, composto por fungos parasitas e saprofíticos (Longcore & Simmons, 2001) e foi citada como “a pior doença infecciosa já registrada entre os vertebrados em termos de número de espécies impactadas e sua propensão a levá-los a extinção” (Fisher & Garner 2007). Atualmente o *Bd* possui ocorrência registrada na maioria dos continentes (Fig. 1), tendo sido detectado em 52 países e em 42% das espécies de anfíbios até então amostradas (Olson *et al.* 2013).



**Figura 1:** Distribuição mundial do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Fonte: Olson *et al.* (2013).

Existem duas hipóteses que competem pela explicação da emergência de doenças infecciosas na natureza. A hipótese de patógeno endêmico (*Endemic Pathogen Hypothesis*) sugere que um patógeno que já estava disseminado no ambiente, encontrou novos hospedeiros ou teve aumento em patogenicidade devido a modificações ambientais (Rachowicz *et al.* 2005). Em relação à quitridiomiose, um estudo propôs que o *Bd* sempre existiu na natureza, e devido à influência de determinados fatores como alterações ambientais, ou mutações, tornou-se patogênico e virulento (Skerratt *et al.* 2007).

A hipótese de patógeno novo (*Novel Pathogen Hypothesis*) sugere que o patógeno, ou uma cepa virulenta recentemente evoluída do patógeno, se espalhou em novas regiões geográficas encontrando novos hospedeiros ou espécies altamente susceptíveis à infecção (Alford 2001, Rachowicz *et al.* 2005). Em relação ao *Bd*, acreditava-se que a África era local de origem, já que é um fungo comum em sapos africanos e o declínio de populações é pouco documentado (Weldon *et al.* 2004). Levando em conta que, um dos mecanismos nos quais os patógenos podem ser introduzidos na natureza é a movimentação da vida selvagem, o transporte nacional e internacional de espécies, o comércio mundial de espécies africanas como *Xenopus laevis* e *Xenopus tropicalis*, dá um maior suporte a essa hipótese (Daszak *et al.* 1999, Weldon *et al.* 2004).

Ainda dentro desse cenário, o comércio mundial a norte-americana, rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), também foi considerada como parte da dinâmica de disseminação da doença, sendo que essa espécie é resistente ao *Bd*, comercializada por todo o mundo, e foi introduzida em diversos ambientes (Fisher & Garner 2007). Essa hipótese foi corroborada devido ao fato de até então ter sido constatada pouca ou nenhuma variabilidade genética entre as cepas isoladas no mundo todo (Kilpatrick *et al.* 2009). Entretanto, foram identificadas novas linhagens de *Bd* (apenas no Brasil existem no mínimo

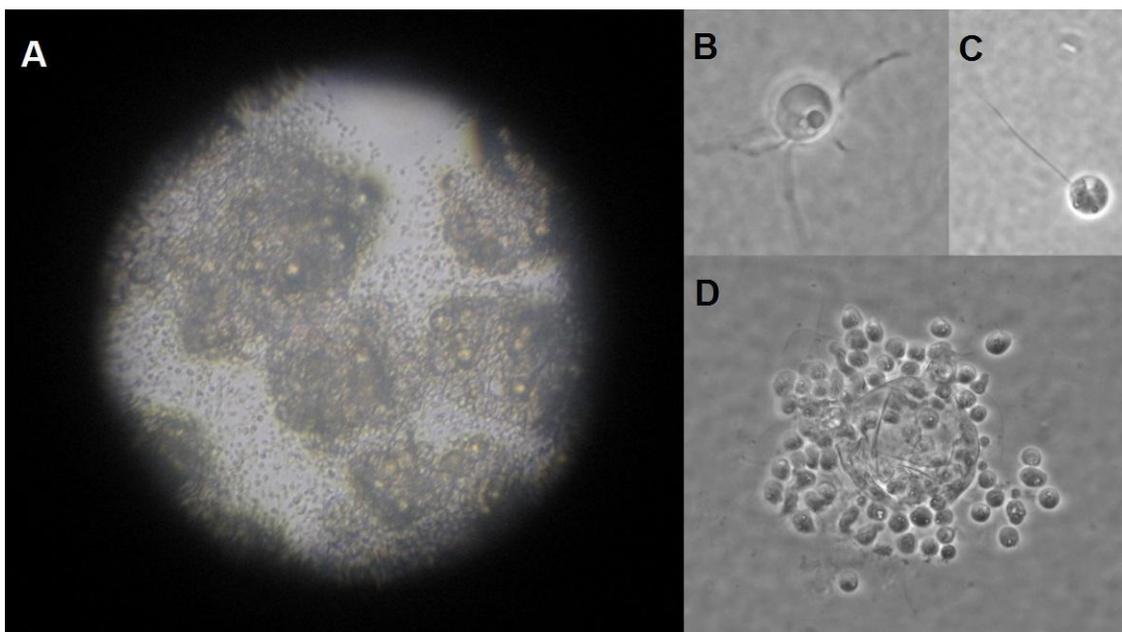
três linhagens diferentes) (Schloegel *et al.* 2012) demonstrando que realmente existe variabilidade genética, que a linhagem denominada *linhagem pandêmica global (Bd-GPL)* possui a maior variabilidade genética antes prevista (Rosenblum *et al.* 2013) e que o *Bd* existe e vem infectando os anfíbios há muito tempo antes do declínio de populações ter a quitridiomicrose considerada como uma das principais causas (Rodriguez *et al.* 2014).

Em determinadas regiões o *Bd* parece ter sido introduzido e se espalhou de um ponto de origem, e sua disseminação segue um padrão de onda (*Wake-like pattern*) (Lips *et al.* 2006, Lips *et al.* 2008). No Brasil diversos casos de infecção por *Bd* estão sendo documentados (Toledo *et al.* 2006a, Toledo *et al.* 2006b, Carnaval *et al.* 2006, Vieira *et al.* 2012, Schloegel *et al.* 2012, Vieira *et al.* 2013, Ramalho *et al.* 2013, Lisboa *et al.* 2013, Rodriguez *et al.* 2014), porém o declínio de populações até então não foi associado à quitridiomicrose e, nesse sentido, um estudo recente indica que o *Bd* está presente na Mata Atlântica há pelo menos um século, tendo o registro mais antigo de *Bd* até então, suportando a hipótese de que no Brasil o fungo é um patógeno endêmico (Rodriguez *et al.* 2014).

Em relação à sua fisiologia, o *Bd* pode crescer em uma ampla faixa de temperatura que varia de 4 à 28°C, com temperatura ótima de crescimento entre 17 à 23°C, e pH ótimo entre 6 e 7. Também foi verificado que os zoósporos do *Bd* são capazes de manter sua atividade por até 24 horas, e podem nadar por uma distância de no máximo 2 cm (Piotrowsky *et al.* 2004). O *Bd* também pode se apresentar em uma forma encistada, que pode ser capaz de sobreviver em longo prazo fora de seu hospedeiro, no ambiente (DiRosa *et al.* 2007, Mitchell *et al.* 2008).

O *Bd* é um fungo aquático, com dois ciclos de vida distintos: O estágio livre-natante, representado pelo zoósporo, e o estágio fixo ao substrato, representado pelo

zoosporângio. O zoósporo locomove-se utilizando um flagelo, iniciando assim a colonização nas células queratinizadas da epiderme dos anfíbios (Longcore *et al.* 1999, Rosenblum *et al.* 2010). Dentro das células epidérmicas do hospedeiro, o zoósporo forma um talo esférico que “amadurece” e produz novos zoósporos por divisão assexuada, renovando assim o ciclo de infecção quando os zoósporos são liberados na superfície da pele do hospedeiro (Rosenblum *et al.* 2010) (Fig. 2).



**Figura 2:** Colônia isolada do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (A), detalhes do zoosporângio com rizoides (B), zoósporo livre natante (C) e zoosporângio liberando zoósporos *in vitro* (D). Fotos: Luís Felipe Toledo.

O mecanismo de penetração do *Bd* na pele dos anfíbios foi descrito recentemente, no qual os zoósporos encistam na pele do hospedeiro e formam um tubo germinativo que penetra na membrana celular do hospedeiro, assim transferindo seu conteúdo no interior das células (Greenspan *et al.* 2012). Após esse processo, ocorre a maturação do zoosporângio e a formação de papilas para liberação dos zoósporos (Berger *et al.* 2005, Greenspan *et al.* 2012).

Com a liberação dos zoósporos, os indivíduos se reinfectam e infectam outros indivíduos, através de mecanismos como: contato com a água, já que os zoósporos são aquáticos, contato direto durante o acasalamento, através dos girinos ou através de outros comportamentos agregativos (Piotrowski *et al.* 2004).

Em indivíduos adultos, o *Bd* é encontrado em maior quantidade na região inguinal e nas membranas interdigitais dos membros posteriores, enquanto que nos girinos prevalece no aparato bucal, afetando os denticulos e bico córneo (Knapp & Morgan 2006). Em aproximadamente 90% dos casos, a despigmentação do aparato bucal de girinos (Fig. 3) é provocada devido à infecção por *Bd* (Knapp & Morgan 2006), porém existem outros fatores que podem ocasionar esse quadro, como a presença de poluentes no ambiente ou até a fase de desenvolvimento do girino (Boyle *et al.* 2004, Rachowicz & Vredenburg 2004).



**Figura 3.** Prancha que representa o aumento na intensidade de infecção por *Bd* em girinos da espécie *Hylodes phyllodes*, sendo da esquerda para a direita: infecção branda à grave. Foto: Yuri Messias.

Em um experimento realizado em laboratório, indivíduos foram infectados com *Bd* e apresentaram os seguintes sinais clínicos: letargia, inapetência, perda de reflexo, eritema cutâneo, postura anormal e descamação irregular da pele (Voyles *et al.* 2011). Nos indivíduos que desenvolvem a doença, o fungo se prolifera na epiderme causando hiperqueratose, que é um aumento no número de camadas de queratina que formam a pele

do anfíbio (Pessier *et al.* 1999), e resulta em um desequilíbrio na troca de gases, água e eletrólitos pela pele. Em um estudo realizado com indivíduos da espécie *Litoria caerulea* que foram infectados com o *Bd*, foi verificado que através do colapso nos processos de transporte através da pele, ocorreram reduções nas concentrações de sódio e potássio do plasma sanguíneo, causando morte dos indivíduos que desenvolvem a doença por parada cardíaca (Voyles *et al.* 2009).

A fisiologia ativa da pele dos anfíbios explica a letalidade do *Bd*, pois em outros vertebrados, infecções fúngicas não são letais (Rosenblum *et al.* 2010). Contudo, além das alterações funcionais da pele, recentemente foi descoberto que o *Bd*, assim como outros fungos patogênicos, produz fatores tóxicos que inibem potencialmente a resposta imune do hospedeiro através da inibição da proliferação de linfócitos causando apoptose de células alvo (Fites *et al.* 2013).

O *Bd* é registrado em sua grande maioria em anfíbios anuros, pois representa a ordem com maior número de espécies entre os anfíbios (Haddad *et al.* 2013), porém recentemente foi registrado em espécies da ordem Gymnophiona (Gower *et al.* 2013), e foi descrita uma nova espécie no gênero *Batrachochytrium*, que até então possuía apenas uma espécie descrita, que ataca exclusivamente salamandras: *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel *et al.* 2013).

Sabe-se que os anfíbios são os únicos vertebrados nos quais a infecção por *Bd* é letal, porém, o *Bd* já foi encontrado em aves (Garmyn *et al.* 2012) e répteis (Kilburn *et al.* 2011), que funcionam como potenciais vetores da doença. Também foi detectado em camarões de água doce na Austrália (Rowley *et al.* 2006), e foi descoberto que o *Bd* infecta e causa mortalidade em uma espécie de nematódeo: *Caenorhabditis elegans*, que pode

servir como modelo para estudos de patogenicidade e virulência do *Bd* (Shapard *et al.* 2012).

Existem diversos fatores que podem exercer influência na dinâmica da quitridiomiose na natureza. Fatores esses extrínsecos ao *Bd* como: fatores relacionados à altitude, cobertura das nuvens (Pounds *et al.* 2006, Kriger & Hero 2008, Gründler *et al.* 2012), cobertura de dossel (Becker *et al.* 2012), grau de desmatamento (Becker & Zamudio 2011), sazonalidade (Kriger & Hero 2007, Longo *et al.* 2010, Kinney *et al.* 2011), e aspectos relacionados ao hospedeiro como: diferentes habitats reprodutivos (Bancroft *et al.* 2011, Gründler *et al.* 2012), comportamento (Rowley & Alford, 2007), densidade (Han *et al.* 2008), e diferenças no sistema imunitário (Ramsey *et al.* 2010). Em relação ao patógeno, fatores intrínsecos ao *Bd* também são reconhecidos: variação genotípica, com a detecção de diferentes linhagens na natureza (Farrer *et al.* 2011, Schloegel *et al.* 2012, Rosenblum *et al.* 2013, Bataille *et al.* 2013). Também podemos citar a variação em virulência (Berger *et al.* 2005, Fisher *et al.* 2009), tamanho de zoósporos e zoosporângios (Longcore *et al.* 1999, Fisher *et al.* 2009, Schloegel *et al.* 2012 Flechas *et al.* 2013).

Diante dos fatores acima citados, este trabalho teve como objetivos: 1) Verificar se existe variação genotípica em cepas de *Bd* provenientes de um gradiente de elevação; 2) Verificar se existe variação em tamanho dos zoósporos e zoosporângios das mesmas cepas; 3) Verificar se existe correlação entre a morfologia do *Bd* com prevalência, intensidade de infecção em taxa de crescimento; e finalmente verificar se a prevalência e intensidade de infecção aumentam conforme o aumento da elevação.

Em relação à variação genotípica, existem pelo menos seis linhagens descritas na natureza, sendo o genótipo mais virulento conhecido como: *Linhagem pandêmica global* (*Bd*-GPL) (Farrer *et al.* 2011, Schloegel *et al.* 2012), e essa linhagem é de distribuição

mundial. Outras linhagens também foram descritas em outras localidades, como *Bd*-CH e *Bd*-CAPE (Farrer *et al.* 2011), e *Bd*-KOREA (Bataille *et al.* 2013). No Brasil foram encontradas duas outras linhagens, denominadas *Bd*-Brazil e um híbrido, *Bd*-Hybrid (Schloegel *et al.* 2012, Rosenblum *et al.* 2013).

Já em relação à variação morfológica, foi detectado em cepas de *Bd* provenientes da Europa, que o tamanho dos zoosporângios é linearmente correlacionado com a diferenciação genética das cepas, e que existe uma associação entre variação morfológica e virulência (Fisher *et al.* 2009, Flechas *et al.* 2013). Também foi detectado que tamanho dos zoósporos de diferentes cepas de *Bd* é associado com o conteúdo de DNA, sugerindo uma variação na ploidia das diferentes cepas, sendo que essas variam em ploidia linearmente com o aumento do diâmetro dos zoósporos (Schloegel *et al.* 2012). Porém, o papel da morfologia da dinâmica da doença ainda não é conhecido.

Sabe-se que o *Bd* apresenta uma ampla faixa de temperatura de crescimento (Piotrowsky *et al.* 2004), e que há uma diferença na mortalidade de indivíduos infectados quando expostos a diferentes temperaturas (Andre *et al.* 2008). Porém, não existem estudos que relacionam diferentes taxas de crescimento com dados de prevalência e intensidade de infecção do *Bd* em determinadas áreas, assim como com variações morfológicas.

Quanto à elevação, sabe-se que o declínio mundial de populações de anfíbios está concentrado em regiões montanhosas (Kriger & Hero 2008), e alguns estudos verificaram que a prevalência e intensidade da infecção são maiores em altitudes mais elevadas (Walker *et al.* 2010, Kriger *et al.* 2008, Gründler *et al.* 2012). Porém, outros estudos encontraram o oposto (Kriger & Hero 2006, Brem & Lips 2008, Kriger *et al.* 2008), e apenas um estudo verificou que a prevalência e intensidade de infecção aumentam conforme o aumento da elevação (Gründler *et al.* 2012). Contudo, estudos prévios não controlaram fatores como

diferenças em habitat reprodutivo e sistema imune do hospedeiro, que podem ter influência nos dados de prevalência e intensidade de infecção (Ramsey *et al.* 2010, Bancroft *et al.* 2011, Gründler *et al.* 2012).

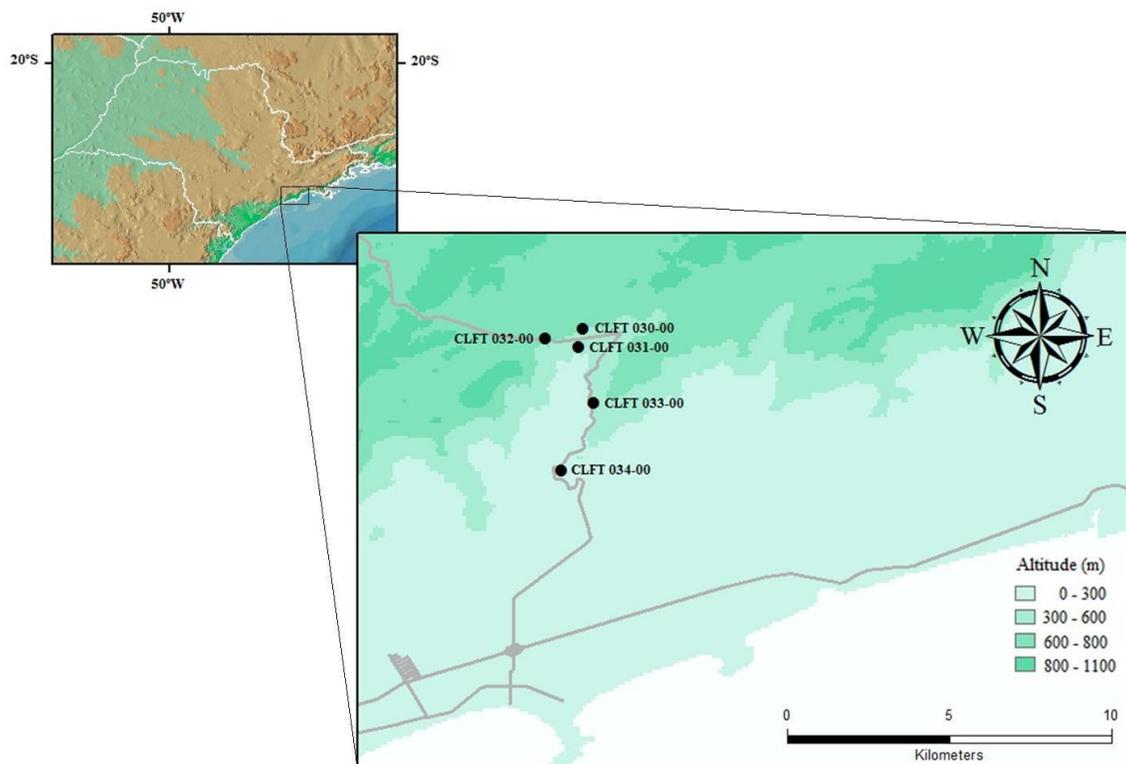
No presente trabalho, controlamos diversas variáveis que poderiam influenciar nossos resultados, como a utilização de uma única espécie: *Hylodes phyllodes* (Fig. 4), endêmica da Mata Atlântica, que possui alta abundância local, atividade diurna e hábito reofílico (Haddad *et al.* 2013), distribuindo-se desde o nível do mar até o topo da Serra do Mar, a mais de 1000 m de altitude (obs. pessoal).



**Figura 4.** Espécime macho de *Hylodes phyllodes*. Foto: Luís Felipe Toledo.

Foram definidos oito pontos de coleta (23.707690 S, 46.038810 W; 23.712550 S, 46.039990 W; 23.710120 S, 46.049320 W; 23.728280 S, 46.036001 W; 23.746689 S, 46.044939 W; 23.733773 S, 46.035859 W, 23.710692 S, 46.042851 W e 23.722360 S, 46.037147 W) que abrangeram cinco cotas altitudinais de 200 à 700 metros com uma

diferença de 100 metros entre cada uma (Fig. 5), e também foram uniformizadas características como: região geográfica, habitat reprodutivo, estágio de vida, estação do ano, e os pontos de coleta apresentavam cobertura de dossel semelhante.



**Figura 5.** Mapa indicando pontos de coleta nas 5 cotas altitudinais definidas na Rodovia Mogi-Bertioga (SP-098), que abrange os municípios de Biritiba-Mirim e Bertioga, São Paulo. Cada código representa uma cepa de *Bd* que foi isolada.

Até então, não existem estudos que estabeleçam uma relação entre os diversos fatores que influenciam as taxas de infecção por *Bd* acima citados. Espera-se com os resultados obtidos neste trabalho estabelecer uma relação entre variação morfológica e dados de prevalência e intensidade de infecção, e taxa de crescimento do *Bd*, em cepas

isoladas de um gradiente de elevação na Mata Atlântica. A compreensão dessas relações é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos de ação da quitridiomicose na natureza, contribuindo assim para a caracterização de áreas que podem apresentar maior risco, e conseqüentemente para o desenvolvimento de planos de conservação para os anfíbios não somente do Brasil, mas como de todo o planeta.

## REFERÊNCIAS

- Alford, R. A. 2001. Testing the novel pathogen hypothesis. Page 20 in R. Speare, editor. *Developing management strategies to control amphibian diseases: decreasing the risks due to communicable diseases*. School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University, Townsville, Australia.
- Andre, S. E., Parker, J. & Briggs, C. J. 2008. Effect of temperature on host response to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 716-720.
- Bancroft, B. A., Han, B. A., Searle, C. L., Biga, L. M., Olson, D. H., Kats, L. B. & Blaustein, A. R. 2011. Species-level correlates of susceptibility to the pathogenic amphibian fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the United States. *Biodiversity and Conservation*, 20: 1911-1920.
- Bataille, A., Fong, J. J., Cha, M., Wogan, G. O., Baek, H. J., Lee, H. & Waldman, B. 2013. Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology*, 22: 4196-4209.
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F. & Prado, P. I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, 318: 1775-1777.
- Becker, C. G. & Zamudio, K. R. 2011. Tropical amphibian population experience higher disease risk in natural habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 9893-9898.

- Becker, C. G., Rodriguez, D., Longo, A. V., Talaba, A. L. & Zamudio, K. R. 2012. Disease risk in temperate amphibian populations is higher at closed-canopy sites. *PloS One*, 7: e48205.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 9031-9036.
- Berger, L., Speare, R. & Hyatt, A. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines and disappearances of Australian frogs*. Environment Australia, Canberra, 1999, 23-33.
- Berger, L., Marantelli, G., Skerratt, L. F. & Speare, R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 47-50.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., Hyatt, A. D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 141-148.
- Brem, F. M. & Lips, K. R. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81: 189-202.
- Carey, C. 1993. Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology*, 7: 355-362.

- Carnaval, A. C. O. Q., Puschendorf, R., Peixoto, O. L., Verdade, V. K. & Rodrigues, M. T. 2006. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth*, 3: 41-48.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E. & Speare, R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 735-748.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. & Hyatt, A. D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9: 141-150.
- Di Rosa, I., Simoncelli, F., Fagotti, A. & Pascolini, R. 2007. Ecology: The proximate cause of frog declines? *Nature*, 447: E4-E5.
- Fisher, M. C. e Garner, T. W. J. 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced species. *Fungal Biology Reviews*, 21: 2-9.
- Fisher, M. C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D. A., Walker, J., Selway, L., Brown, J. P., Walker, L. A., Gow, N. A. R., Stajich, J. E., Garner, T. W. J. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, 18: 415-429.
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W., Balloux, F., Clare, F. & Fisher, M. C. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 18732-18736.
- Fites, J. S., Ramsey, J. P., Holden, W. M., Collier, S. P., Sutherland, D. M., Reinert, L. K. & Rollins-Smith, L. A. 2013. The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science*, 342: 366-369.

- Flechas, S. V., Medina, E. M., Crawford, A. J., Sarmiento, C., Cárdenas, M. E., Amézquita, A., Restrepo, S. 2013. Characterization of the first *Batrachochytrium dendrobatidis* isolate from the Colombian Andes, an amphibian biodiversity hotspot. *EcoHealth*, DOI: 10.1007/s10393-013-0823-9.
- Garmyn, A., Van Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T., Van Den Broeck, W., Haesebrouck, F. & Martel, A. 2012. Waterfowl: Potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One*, 7: e35038.
- Gower, D. J., Doherty-Bone, T., Loader, S. P., Wilkinson, M., Kouete, M. T., Tapley, B. & Garner, T. W. 2013. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and lethal chytridiomycosis in caecilian amphibians (Gymnophiona). *EcoHealth*, 10: 173-183.
- Greenspan, S. E., Longcore, J. E. & Calhoun, A. J. 2012. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 100: 201-210.
- Gründler, M. C., Toledo, L. F., Parra-Olea, G., Haddad, C. F. B., Giasson, L. O. M., Sawaya, R. J., Prado, C. P. A., Araújo, O. G. S., Zara, F. J., Centeno, F. C., Zamudio, K. R. 2012. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection load of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97: 173-184.
- Haddad, C. F. B., Toledo, L. F., Prado, C. P. A., Loebmann, D., Gasparini, J. L. & Sazima, I. 2013. *Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia*.
- Han, B. A., Bradley, P. W. & Blaustein, A. R. 2008. Ancient behaviors of larval amphibians in response to an emerging fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63: 241-250.

- Johnson, P. T., Lunde, K. B., Ritchie, E. G. & Launer, A. E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science*, 284: 802-804.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R. & Belden, L. K. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410: 681-684.
- Kilburn, V. L., Ibáñez, R. & Green, D. M. 2011. Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97: 127-134.
- Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J., Daszak, P. 2009. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 1-10.
- Kinney, V. C., Heemeyer, J. L., Pessier, A. P. & Lannoo, M. J. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: Affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". *PLoS One*, 6: e16708.
- Knapp, R. A. & Morgan, J. A. T. 2006. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia*, 2:188-197.
- Kruger, K. M., Pereoglou, F. & Hero, J. M. 2007. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in Eastern Australia. *Conservation Biology*, 21: 1280-1290.
- Kruger, K. M. & Hero, J. M. 2008. Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs. *Austral Ecology*, 33: 1022-1032.
- Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J. & Collins, J. P. 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical

- amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 3165-3170.
- Lips, K. R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J. R. & Sears, M. W. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology*, 6: e72.
- Lisboa, B. S., Neves, J. M. M., Nascimento, F. A. C., Tavares-Bastos, L. e Mott, T. 2013. New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil. *North-Western Journal of Zoology*, 9: 132505.
- Longcore, J.E., A.P. Pessier e D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91:219-227.
- Longcore, J. E. & Simmons, D. R. 2001. Chytridiomycota. *eLS*.
- Longo, A. V., Burrowes, P. A. & Joglar, R. L. 2010. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 253-260.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. & Wilson, S. P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157: 2903-2927.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C. & Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 15325-15329.

- McMenamin, S. K., Hadly, E. A., Wright, C. K. 2008. Climate change and wetland dissection cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 16988-16993.
- Mitchell, K. M., Churcher, T. S., Garner, T. W. & Fisher, M. C. 2008. Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 329-334.
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnemberg, K. L., Powell, C. L., Walker, S., F., Bielby, J., Garner, T., W. J., Weaver, G. & Fisher, M. C. 2013. Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PLoS One*, 8: e56802.
- Pessier, A. P. & J. R. Mendelson. 2009. A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. Conservation Breeding Specialist Group, 1-229.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., Longcore, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96: 9-15.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S. R., Sánchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J., Young, B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161-167.
- Rachowicz, L. J. e Vredenburg, V. T. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61: 75-83.

- Rachowicz, L. J., Hero, J., Alford, R. A., Taylor, J. W., Morgan, J. A., Vredenburg, V. T. & Briggs, C. J. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology*, 19: 1441-1448.
- Ramalho, A. C. O., De Paula, D., Luiz Catão-Dias, J., Vilarinho, B. & Albuquerque Brandão, R. 2013. 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*, 9: 131504.
- Ramsey, J. P., Reinert, L. K., Harper, L. K., Woodhams, D. C. & Rollins-Smith, L. A. 2010. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and immunity*, 78: 3981-3992.
- Rodriguez, D., Becker, C. G., Pupin, N. C., Haddad, C. F. B. & Zamudio, K. R. 2014. Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23: 774-787.
- Rosemlum, E. B., Voyles, J., Poorten, T. J., Stajich, J. E. 2010. The deadly chytrid fungus: A story of an emerging pathogen. *PLoS Pathogens*, 6:e1000550.
- Rosemlum, E. B., James, T. Y., Zamudio, K., Poorten, T. J., Ilut, D., Rodriguez, D., Eastman, J., Richards-Hrdlicka, K., Joneson, S., Jenkinson, T. S., Longcore, J., Parra-Olea, G., Toledo, L. F., Arellano, M. L., Tovar, E. M., Restrepo, S., Flechas, S. V., Berger, L., Briggs, C. & Stajich, J. E. 2013. A complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 2-6.

- Rowley, J. J., Alford, R. A. & Skerratt, L. F. 2006. The amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* occurs on freshwater shrimp in rain forest streams in Northern Queensland, Australia. *EcoHealth*, 3: 49-52.
- Rowley, J. J. & Alford, R. A. 2007. Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77: 1-9.
- Schloegel, L. M., Toledo, L. F., Longcore, J. E., Greenspan, S. E., Vieira, C. A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C. M., Hipólito, M., Davies, A. J., Cuomo, C. A., Dasdak, P., James, T. Y. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 1-16.
- Semlitsch, R. D. *Amphibian Conservation*. 2003. Smithsonian Institution. Unites States of America.
- Shapard, E. J., Moss, A. S. & San Francisco, M. J. 2012. *Batrachochytrium dendrobatidis* can infect and cause mortality in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mycopathologia*, 173: 121-126.
- Skerratt, L. F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K. R., Phillott, A. D., Hines, H. B., Kenyon, N. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, 4: 125-134.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L. & Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783–1786.
- Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., Carnaval, A. C. O. Q & Britto, F. B. 2006a. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation*, 4: 17-21.

- Toledo, L. F., Britto, F. B., Araújo, O. G. S., Giasson, L. M. O & Haddad, C. F. B. 2006b. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and inclusion of 17 new cases. *South American Journal of Herpetology*, 1: 185-191.
- Toledo, L. F. 2009. Anfíbios como bioindicadores. In: Neumann-Leitão, S. & El-Dier, S. (Orgas) *Bioindicadores de qualidade ambiental*. Recife: Instituto Brasileiro Pós-Cidadania. Pp. 196-208.
- Vieira, C. A., Almeida, C. H. L. N., Lambertini, C., Leite, D. S., Toledo, L. F. 2012. First record of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*; Rhizophydiales; Chytridiaceae) in the state of Paraná, southern Brazil. *Herpetological Review*, 43(1): 93-94.
- Vieira, C. A., Toledo, L. F., Longcore, J. E. & Longcore, J. E. 2013. Body length of *Hylodes cf. ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. *Brazilian Journal of Biology*, 73(1): 195-199.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A. & Speare, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326: 582-585.
- Voyles, J., Rosenblum, E. B. & Berger, L. 2011. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 13: 25-32.
- Walker, S. F., Bosch, J., Gomez, V., Garner, T. W., Cunningham, A. A., Schmeller, D. S. & Fisher, M. C. 2010. Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology letters*, 13: 372-382.

Weldon, C., Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 2100-2105.

## ARTIGO

### **Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics**

#### **Abstract**

Wildlife populations worldwide are declining due to the emergence of infectious diseases. Given the predicted increase in wildlife diseases with anthropogenic habitat change, the development of methods to rapidly determine the potential infection outcome in populations of conservation concern will enhance our ability to predict species and areas in critical risk. Here, we tested if phenotypic variation in the amphibian killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), could be a predictor of disease dynamics in natural populations. We quantified variation in *Bd* zoospore and zoosporangium sizes and growth rates in five isolates collected along an altitudinal gradient and correlated those with disease prevalence and infection loads at the same sites. In contrast to previously published findings, prevalence and infection load did not increase with elevation in our montane transect. Instead, we found that zoospore size was associated with prevalence and infection load, and zoosporangium size was associated with prevalence. *Bd* growth rates were not associated with *Bd* zoospore and zoosporangia size, prevalence and infection load. Nevertheless, we showed that *Bd* phenotype predicts disease status in wild populations. An index was developed that can be used to identify critical environments where the fungus could be more deleterious to its amphibian hosts.

**Keywords:** Chytridiomycosis, disease dynamics, morphology, infection indexes.

## Introduction

The amphibian-killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis* (hereafter *Bd*), causes chytridiomycosis, which is a main factor contributing to amphibian population declines and extinctions worldwide (Berger *et al.* 1998, Stuart *et al.* 2004, Wake & Vredenburg 2008). *Bd* is distributed on almost all continents (Olson *et al.* 2013), but we are still unable to accurately predict the likelihood of disease outbreaks in different species or localities. Distributional models based on climate and topographical information, such as temperature, precipitation, humidity and elevation (Ron 2005, Rödder *et al.* 2008, Rödder *et al.* 2009, 2010), have been used to predict the current (Ron 2005, Puschendorf *et al.* 2009, Murray *et al.* 2011) and future (Rödder *et al.* 2009, 2010, Rohr *et al.* 2011) distributions of this fungus. These models infer the potential occurrence of *Bd* at continental and global scales but only indirectly predict the likelihood of disease outcomes. For example, models predict that *Bd* has a higher probability of occurrence at high elevations, where mean temperatures and cloud cover provide better (or ideal) conditions for its growth. However, not all high elevation sites appear to respond equally to *Bd* infection (Lips 1998, Piotrowsky *et al.* 2004, La Marca *et al.* 2005, Pounds *et al.* 2006, Kriger & Hero 2008, Gründler *et al.* 2012). Therefore complementary fine-scale studies are necessary to reveal the multitude of factors that have been shown to influence the local disease dynamics, such as canopy cover (Becker *et al.* 2012), deforestation (Becker & Zamudio 2011), seasonality (Kriger & Hero 2007, Longo *et al.* 2010, Kinney *et al.* 2011), host breeding habitat (Bancroft *et al.* 2011, Gründler *et al.* 2012), taxonomy (Blaustein *et al.* 2005, Bancroft *et al.* 2011), behavior (Rowley & Alford 2007), density (Han *et al.* 2008), and individual immunity (Ramsey *et al.* 2010). Therefore, a clear understanding of

the local distribution and dynamics of *Bd* often requires data that are time demanding and/or expensive to collect.

Most predictive models and direct studies of population dynamics focus on extrinsic factors affecting *Bd*, but intrinsic factors (pathogen traits or characteristics) can also explain the performance of pathogens in natural environments. *Bd* strains vary in genotype and can be subdivided into both endemic and pandemic lineages (Farrer *et al.* 2011, Schloegel *et al.* 2012, Rosenblum *et al.* 2013, Bataille *et al.* 2013) that differ significantly in chromosomal copy number and virulence (Rosenblum *et al.* 2013, Farrer *et al.* 2013, Longo *et al.* 2013). In addition to differences in virulence (Berger *et al.* 2005, Fisher *et al.* 2009), other phenotypes related to transmission may vary. For example, the size of zoospores varies from 2 to 6  $\mu\text{m}$  (Longcore *et al.* 1999, Fisher *et al.* 2009, Schloegel *et al.* 2012) and the size of zoosporangia varies from 15 to 68  $\mu\text{m}$  (Fisher *et al.* 2009, Farrer *et al.* 2011, Flechas *et al.* 2013) among strains. Some genotypic variation is correlated with phenotypic variation, suggesting a genetic basis for inter-strain differences. For example, zoosporangia size was correlated to virulence (Fisher *et al.* 2009) and zoospore size was correlated to DNA content (Schloegel *et al.* 2012) in two independent studies.

Because some aspects of *Bd* phenotype and pathogenicity have been shown to be associated with distinct genotypes, we hypothesized that comparable measurements of *Bd* phenotypes across amphibian populations may be correlated with various aspects of the natural disease cycle. For example, genotypes with smaller zoosporangia may be able to transmit at a faster rate, but they may have an overall lower virulence. Understanding *Bd* phenotypes and their relationships with disease epidemiology could be key to studies of *Bd* evolution at multiple spatial scales (Farrer *et al.* 2013) if *Bd* phenotypes do in fact have functional consequences for host-pathogen interactions. In addition, *Bd* phenotype can be

measured everywhere and relatively easily (e.g., cheaply and rapidly) and in a systematic way that would capture within and among population variation. To test our hypothesis we genotyped and quantified the phenotypes of *Bd* zoospores and zoosporangia isolated across an altitudinal range in the Brazilian Atlantic forest. Our study standardized host amphibian species, breeding habitat, latitude, and season of the year, reducing extrinsic factors that might influence the association between pathogen phenotypes and infection dynamics in these populations. Specifically, we tested whether *Bd* morphology can be a predictor of infection prevalence (proportion of infected hosts) and infection intensity (number of zoospores in infected individuals) in natural populations, as well as if these infections parameters increase with the elevation and *Bd* growth rate. Finally, we provide an index that can be applied to disease monitoring in other amphibian communities infected by *Bd*.

## **Methods**

### **Study Site and Specimens**

*Hylodes phyllodes* specimens were collected along an elevational gradient (from 200 to 700 meters above sea level: a.s.l.) at the Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga-Pilões, in the municipalities of Biritiba-Mirim and Bertioga, State of São Paulo, southeastern Brazil. We performed field collectings between November and January (summer season), during two years. We sampled eight streams in five elevational bands (200-300, 301-400, 401-500, 501-600 and 601-700 meters a.s.l.) (Tab 1). All streams had approximately the same width, water flow, were inside the forest, and had similar canopy cover. We collected at least 20 adults per elevational band. Each individual was kept isolated in a plastic bag, to avoid cross-contamination. At least five individuals per

elevation were deposited at the Museu de Zoologia “prof. Adão José Cardoso” (ZUEC), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil. We also collected at least five *H. phyllodes* tadpoles at each site. All field collections were approved by permits issued by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio: 26972-1) and the Instituto Florestal (COTEC/SMA: 260106 - 011.309/ 2011).

### ***Bd* sampling from adult frogs**

At the time of capture, we swabbed all adult *Hylodes* following standard field sampling protocols for *Bd* detection (Hyatt *et al.* 2007). Each swab was placed into a 1.5ml cryotube and stored at -20°C. For detection and quantification of *Bd* zoospores, we first extracted DNA from swabs using PrepMan ULTRA® (Life Technologies), and then quantified infection intensities for each frog using a TaqMan® qPCR Assay (Life Technologies) (Boyle *et al.* 2004; with modifications described in Kriger *et al.* 2006 and Lambertini *et al.* 2013).

### ***Bd* sampling from tadpoles**

We screened tadpoles for possible *Bd* infection by examining their mouthparts (Lambertini *et al.* 2013, Vieira *et al.* 2013). Mouthparts were dissected and visualized by light microscopy for detection of *Bd* zoosporangia (Lambertini *et al.* 2013). Each mouthpart piece containing zoosporangia was purified by dragging in 1% tryptone culture medium, and transferred to sterile plates containing 1% tryptone culture medium with G-penicillin (200mg/L) and streptomycin sulfate (350mg/L) antibiotics (Vieira & Toledo 2012). We grew *Bd* colonies for one week and then extracted the DNA from each pure culture for genotyping.

We genotyped five isolated strains, one from each elevational band. DNA extraction followed the protocol published by James *et al.* (2008), and for genotyping we used ten SNP markers that were diagnostic for *Bd*-GPL and *Bd*-Brazil, including markers 8009X2 and R6046 that can differentiate panzootic strains of the *Bd*-GPL clade into groups 1 or 2 (Schloegel *et al.* 2012). DNA sequencing was conducted at the University of Michigan Sequencing Core, with analysis of sequencing chromatograms using the software Sequencher®.

We performed morphometric analyses to phenotype five *Bd* cultures collected on our elevational gradient (Fisher *et al.* 2009, Flechas *et al.* 2013). Cultures were inoculated into 1% tryptone liquid media, and then incubated at 21°C for 7 days. After that, 60 zoospores and 60 zoosporangia of each *Bd* strain was photographed by optical microscopy at 1000 X magnification. Both zoospores and zoosporangia were measured using the TSVIEW® software.

To quantify strain-specific *Bd* growth rates, we produced growth curves at a constant temperature (17°C). We standardized the initial zoospore number at 450,000 zoospores for each strain. After that, the strains were inoculated in 25 mL of liquid media (tryptone 1%), with five replicates for each strain, and incubated at 17°C. Zoospore densities were quantified by qPCR every three days for a duration of nine days. DNA extraction and qPCR analyses followed standard protocols (Boyle *et al.* 2004, Lambertini *et al.* 2013).

## Disease Indexes

We developed two formulae to compare strain-specific zoospore and zoosporangia sizes, prevalence (% of infected individuals), and infection load (number of zoospore DNA equivalents) for each site where a *Bd* strain was collected:

$$\text{Size Index: } SI = \frac{\bar{X}Z + 10\bar{X}z}{2}$$

Where, SI = Size index, Z = Zoosporangia, z = Zoospore, and  $\bar{X}$  = Mean.

$$\text{Infection Index: } II = \frac{\text{Prev} + \left(\frac{\bar{X}\text{Load}}{2}\right)}{2}$$

Where, II = Infection Index, Prev = Prevalence, Load = Infection Load, and  $\bar{X}$  = Mean.

The Size index was developed with strains isolated from tadpoles, and the Infection index was developed using the results obtained from molecular diagnostic from adults. We multiplied the  $\bar{X}z$  by 10 and divided the  $\bar{X}$  Load by 2 to standardize the observed values for both indexes; i.e., so the generated values are not in different orders of magnitude.

## Statistical Analyses

We performed analyses of variance (ANOVA) and a Tukey test *a posteriori*, where the dependent variables were zoospore size and zoosporangium size and the categorical variable was the strain, to verify if zoospores and zoosporangia of each strain varied in size. We performed simple linear regressions to test for meaningful associations among the following variables: zoospore size and zoosporangia size vs. elevation; zoospore size vs. zoosporangia size; *Bd* infection load and *Bd* prevalence vs. elevation; *Bd* infection load vs. *Bd* prevalence; *Bd* infection load vs. zoospore size; *Bd* infection load vs. zoosporangia size; *Bd* prevalence vs. zoospore size; *Bd* prevalence vs. zoosporangia size; zoospore number at

the last day of the growth rate vs. zoospore size, zoosporangia size, *Bd* prevalence, *Bd* infection load; and finally size index vs. infection index.

## Results

We did not detect effects of elevation on *Bd* prevalence ( $P=0.61$ ;  $F_{(1,3)}=0.31$ ; Fig S1A) and infection load ( $P=0.73$ ;  $F_{(1,3)}=0.13$ ; Fig. S1B). The prevalence ranged between 58.33 to 87.5% (Tab. 1), and even not increasing with the elevation, it was higher at the highest elevation. The mean infection load ranged between 99.29 and 959.17 zoospores (Tab. 1), and was higher in the 300-400 m elevational range. We also did not find effects of elevation on zoospore size ( $P=0.14$ ;  $F_{(1,3)}=3.89$ ; Fig S2A) and zoosporangium size ( $P=0.36$ ;  $F_{(1,3)}=1.11$ ; Fig S2B).

The genotypes showed that the five strains belong to the global pandemic lineage clade *Bd*-GPL, subpopulation 2 (*Bd*-GPL-2), a globally dispersed group (Schloegel *et al.* 2012).

Zoospores ranged between 1.30 and 6.34  $\mu\text{m}$  in diameter (Tab. 1) and zoospore size differed significantly among strains ( $P<0.01$ ;  $F_{(1,4)} = 6992.62$ ; Fig S2A). Zoosporangium size ranged between 10.38 and 45.05  $\mu\text{m}$  in diameter (Tab. 1) and the size also differed among strains ( $P<0.01$ ;  $F_{(1,4)} = 4118.49$ ; Fig S2B).

Field estimates of disease dynamics showed an association between zoospore and zoosporangia size ( $P = 0.01$ ;  $F_{(1,3)}=21.43$ ; Fig. 1), and a non-significant relationship between prevalence and infection load ( $P=0.08$ ;  $F_{(1,3)}=6.16$ ), but with a positive trend (Fig. S3). Infection load was associated with zoospore size ( $P = 0.03$ ;  $F_{(1,4)}=12.68$ ; Fig. 2A) and zoosporangium size ( $P = 0.01$ ;  $F_{(1,3)}=23.14$ ; Fig. 2B). *Bd* prevalence was not associated with zoospore size ( $P = 0.08$ ;  $F_{(1,3)}=6.57$ ; Fig. 2C), but was associated with zoosporangium

size ( $P = 0.05$ ;  $F_{(1,3)}=10.08$ ; Fig. 2D). All the analyzed variables with their significance were grouped in a representative scheme for a better visualization (Fig. 3). For all pairwise associations among variables represented in graphics see supplemental material (Fig. S4).

The growth rate of the five strains showed different curves (Fig. 4), but we did not detect associations between the growth rate data with elevation ( $P = 0.91$ ), zoosporangia size ( $P = 0.53$ ), zoospore size ( $P = 0.66$ ), prevalence ( $P = 0.33$ ) and infection load ( $P = 0.29$ ).

As an attempt develop a predictive tool that could be used to identify critical areas where *Bd* can be more pathogenic, we produced a linear regression between the *Size Index* and *Infection Index*, and we detected a strong association ( $P = 0.01$ ; Fig. 5). Therefore, we are showing for the first time that *Bd* phenotype can be used as a potential predictor of disease dynamics in wild amphibian populations.

## Discussion

The effects of elevation on *Bd* prevalence and infection load are still not quite enlightened. Although some studies found prevalence and infection load rates higher at high elevations (Walker *et al.* 2010, Gründler *et al.* 2012), other studies found the opposite (Kriger & Hero 2006, Brem & Lips 2008, present study). Kriger & Hero (2008) found opposing correlations among different areas in Australia. Therefore, this altitude-infection hypothetical correlation must be carefully studied in future approaches. It is possible that not controlling for several extrinsic factors, such as different host species, host life stages, and breeding habitats, may be key to better clarify this aspect of *Bd* epidemiology.

Although we did not find an association between prevalence and infection load, the observed trend can be explained by the possible interaction between these two

measurements. With a higher prevalence, more hosts are shedding zoospores in the environment, increasing the chances of re-infection or cross-contamination, leading to higher loads that increase the outbreak chances when prevalence and infection load surpass critical levels (Vredenburg *et al.* 2010, Kinney *et al.* 2011).

Morphological adaptations are common in pathogenic microorganisms, which to ensure their survival, can rapidly evolve changes in morphology such as cell size, shape and volume (Lambowitz *et al.* 1986, Hajek & Leger 1994, Ballou *et al.* 2010), being such adaptations mechanisms that may facilitate the survival and spread of the pathogen in the host (Kronstad *et al.* 2011). For example, a mechanism that occurs in dimorphic pathogenic fungus as *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis* and *Paracoccidioides brasiliensis* is a temperature-induced phase transition from filamentous to yeast, which is an intrinsic genetic property linked to pathogenicity and virulence (Leberer *et al.* 1997, Maresca & Kobayashi 2000, Klein & Tebbets 2007). To date, no other study had related morphological variation in the pathogenic fungus *Bd* with disease outcomes in wild anuran populations. If phenotypic variation among strains reflects adaptations to local environments, then it is possible that this variation also predicts disease dynamics.

We showed a high *Bd* size variation compared to previous studies (Fisher *et al.* 2009, Schloegel *et al.* 2012, Flechas *et al.* 2013). However, opposite to previous studies (Fisher *et al.* 2009, Schloegel *et al.* 2012), our analysis indicate that such variation is not due to the strain type (as all our strains were *Bd*-GPL), host species (all *H. phyllodes*), life stages (all adults), microhabitat (rivulets inside preserved forests), seasonality (all samples in the summer), elevation (as we did not find a correlation), and latitude. Therefore, other driving forces must be shaping *Bd* phenotypes at our sites.

Zoosporangia size was associated with *Bd* prevalence and infection load, but this may be an indirect relation, since zoosporangia size was also associated with zoospore size. In turn, zoospore size is correlated with DNA content (Schloegel *et al.* 2012), so it is possible that larger genome sizes enhance the infection ability of the fungus, by means of a more efficient genetic machinery. Furthermore, as the growth rate and elevation were not associated with zoospore size, the genome size can explain the associations between zoospore size, prevalence and infection load that we observed. Mitchell *et al.* (2008) also reported that a longer lifespan is correlated with virulence. Hence, it is possible that larger zoospores also live longer than smaller ones, providing an additional explanation for the higher infectiveness of larger zoospores. Alternatively or complementary, larger zoosporangia may also cause greater damage in the skin of infected hosts, than smaller zoosporangia, increasing its virulence (Fisher *et al.* 2009). Therefore, both zoospore and zoosporangia sizes are key factors to understand *Bd* impact on host natural populations.

Finally, we demonstrated a relationship between pathogen morphology and epidemiological variables in wild populations. We propose two indexes that incorporate these variables as a novel tool for identifying areas where amphibians may be more threatened to *Bd*. With these indexes, it is possible to identify areas with higher prevalence and infection intensity through simple morphometric analyses. Such mapping could be readily applied in conservation actions worldwide. Besides that, analyzing *Bd* intrinsic factors will provide comparable measurements between sites, as we are measuring the same data from the same species; not possible when studying extrinsic factors.

Given the factors above, this study gives the possibility to the development of other studies as to identify critical areas where *Bd* can have a major potential to be more pathogenic by using the indexes that we developed; as the phenotypic characterization of

other strains, which is considered key to *Bd* macro and micro-evolution studies; and finally other studies to better understand the relations between infection data and factors related to altitude.

### **Acknowledgements**

Amanda Piffer, Ana Beatriz Carollo, Conrado A. Vieira, Daniel M. Mendes, Diogo Moraes, Luiz Fernando M. de Lima, Mirtis M. G. Ferraz, Paula P. Morão, and Tamilie Carvalho for field and laboratory assistance. Financial support was provided by National Science Foundation (NSF; award number 1159513), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Proc. no: 2011/51694-7; 2012/04160-0; 2012/51694-7), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Proc. no: 405285/2013-2).

## References

- Bancroft, B. A., Han, B. A., Searle, C. L., Biga, L. M., Olson, D. H., Kats, L. B. & Blaustein, A. R. 2011. Species-level correlates of susceptibility to the pathogenic amphibian fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the United States. *Biodiversity and Conservation*, 20: 1911-1920.
- Ballou, E. R., Nichols, C. B., Miglia, K. J., Kozubowski, L. & Alspaugh, J. A. 2010. Two CDC42 paralogues modulate *Cryptococcus neoformans* thermo tolerance and morphogenesis under host physiological conditions. *Molecular Microbiology*, 75: 763-780.
- Bataille, A., Fong, J. J., Cha, M., Wogan, G. O., Baek, H. J., Lee, H. & Waldman, B. 2013. Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology*, 22: 4196-4209.
- Becker, C. G. & Zamudio, K. R. 2011. Tropical amphibian population experience higher disease risk in natural habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 9893-9898.
- Becker, C. G., Rodriguez, D., Longo, A. V., Talaba, A. L. & Zamudio, K. R. 2012. Disease risk in temperate amphibian populations is higher at closed-canopy sites. *PloS One*, 7: e48205.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 9031-9036.

- Berger, L., Marantelli, G., Skerratt, L. F. & Speare, R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 47-50.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Scheessele, E. A., Han, B. A., Pessier, A. P. & Longcore, J. E. 2005. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 19: 1460-1468.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T. & Hyatt, A. D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 141-148.
- Brem, F. M. & Lips, K. R. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81: 189-202.
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W., Balloux, F., Clare, F. & Fisher, M. C. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 18732-18736.
- Farrer, R. A., Henk, D. A., Garner, T. W., Balloux, F., Woodhams, D. C. & Fisher, M. C. 2013. Chromosomal copy number variation, selection and uneven rates of recombination reveal cryptic genome diversity linked to pathogenicity. *PLoS Genetics*, 9: e1003703.
- Fisher, M. C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D. A., Walker, J., Selway, L., Brown, J. P., Walker, L. A., Gow, N. A. R., Stajich, J. E. & Garner, T. W. J. 2009. Proteomic and phenotypic

- profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, 18: 415-429.
- Flechas, S. V., Medina, E. M., Crawford, A. J., Sarmiento, C., Cárdenas, M. E., Amézquita, A. & Restrepo, S. 2013. Characterization of the first *Batrachochytrium dendrobatidis* isolate from the Colombian Andes, an amphibian biodiversity hotspot. *EcoHealth*, 10: 72-76.
- Gründler, M. C., Toledo, L. F., Parra-Olea, G., Haddad, C. F. B., Giasson, L. O. M., Sawaya, R. J., Prado, C. P. A., Araújo, O. G. S., Zara, F. J., Centeno, F. C. & Zamudio, K. R. 2012. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection load of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97: 173-184.
- Hajek, A. E. & St. Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39: 293-322.
- Han, B. A., Bradley, P. W. & Blaustein, A. R. 2008. Ancient behaviors of larval amphibians in response to an emerging fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63: 241-250.
- Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D. & Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 175-192.
- James, T. Y., Stenlid, J., Olson, A. & Johannesson, H. 2008. Evolutionary significance of imbalanced nuclear ratios within heterokaryons of the basidiomycete fungus *Heterobasidion parviporum*. *Evolution*, 62: 2279-2296.

- Kinney, V. C., Heemeyer, J. L., Pessier, A. P. & Lannoo, M. J. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: Affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". PLoS One, 6: e16708.
- Klein, B. S. & Tebbets, B. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. Current Opinion in Microbiology, 10: 314-319.
- Kruger, K. M., Hines, H. B., Hyatt, A. D., Boyle, D. G. & Hero, J. M. 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. Diseases of Aquatic Organisms. 71: 141-148.
- Kruger, K. M. & Hero, J. M. 2007. Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. Journal of Zoology, 271: 352-359.
- Kruger, K. M. & Hero, J. 2008. Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs. Austral Ecology, 33: 1022-1032.
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C. A., Griffiths, E. J., Geddes, J. M. H., Hu, G., Jung, W. E., Kretschmer, M., Saikia, S. & Wang, J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. Nature, 9: 193-203.
- La Marca, E., Lips, K. R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda-Almonacid, J. V. & Young, B. E. 2005. Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). Biotropica, 37: 190-201.
- Lambertini, C., Rodriguez, D., Britto, F. B., Leite, D. S. & Toledo, L. F. 2013. Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Herpetologia Brasileira, 2: 12-17.

- Lambowitz, A. M., Kobayashi, G. S., Painter, A. & Medoff, G. 1983. Possible relationship of morphogenesis in pathogenic fungus, *Histoplasma capsulatum*, to heat shock response. *Nature*, 303: 806-808.
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Harcus, D., Dignard, D., Ash, J. & Thomas, D. Y. 1997. Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCl4p. *Current Biology*, 7: 539-546.
- Lips, K. R. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology*, 12: 106-117.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P. & Nichols, D. K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.
- Longo, A. V., Burrowes, P. A. & Joglar, R. L. 2010. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 253-260.
- Longo, A. V., Rodriguez, D., Leite, D. S., Toledo, L. F., Almeralla, C. M., Burrowes, P. A. & Zamudio, K. R. 2013. ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* strains: implications for qPCR estimates of infection intensity from field-collected amphibian skin swabs. *PloS One*, 8: e59499.
- Maresca, B. & Kobayashi, G. S. 2004. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Karger*, 5: 201-216.
- Mitchell, K. M., Churcher, T. S., Garner, T. W. & Fisher, M. C. 2008. Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 329-334.

- Murray, K. A., Retallick, R. W., Puschendorf, R., Skerratt, L. F., Rosauer, D., McCallum, H. I. & VanDerWal, J. 2011. Assessing spatial patterns of disease risk to biodiversity: implications for the management of the amphibian pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Applied Ecology*, 48: 163-173.
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J. & Fisher, M. C. 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PloS One*, 8: e56802.
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L. & Longcore, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96: 9-15.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N. & Young, B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161-167.
- Puschendorf, R., Carnaval, A. C., VanDerWal, J., Zumbado-Ulate, H., Chaves, G., Bolaños, F. & Alford, R. A. 2009. Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. *Diversity and Distributions*, 15: 401-408.
- Ramsey, J. P., Reinert, L. K., Harper, L. K., Woodhams, D. C. & Rollins-Smith, L. A. 2010. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity*, 78: 3981-3992.
- Rödger, D., Veith, M. & Lötters, S. 2008. Environmental gradients explaining the prevalence and intensity of infection with the amphibian chytrid fungus: the host's perspective. *Animal Conservation*, 11: 513-517.

- Rödger, D., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Garner, T. W. & Lötters, S. 2009. Global amphibian extinction risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity*, 1: 52-66.
- Rödger, D., Kielgast, J. & Lötters, S. 2010. Future potential distribution of the emerging amphibian chytrid fungus under anthropogenic climate change. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 201-207.
- Rohr, J. R., Halstead, N. T. & Raffel, T. R. 2011. Modelling the future distribution of the amphibian chytrid fungus: the influence of climate and human-associated factors. *Journal of Applied Ecology*, 48: 174-176.
- Ron, S. R. 2005. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 37: 209-221.
- Rowley, J. J. & Alford, R. A. 2007. Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77: 1-9.
- Rosenblum, E. B., James, T. Y., Zamudio, K. R., Poorten, T. J., Ilut, D., Rodriguez, D., Eastman, J. M., Richards-Hrdlicka, K., Joneson, S., Jenkinson, T. S., Longcore, J. E., Parra Olea, G., Toledo, L. F., Arellano, M. L., Medina, E. M., Restrepo, S., Flechas, S. V., Berger, L., Briggs, Cheryl, J. & Stajich, J. E. 2013. Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 9385-9390.
- Schloegel, L. M., Toledo, L. F., Longcore, J. E., Greenspan, S. E., Vieira, C. A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C. M., Hipólito, M., Davies, A. J., Cuomo, C. A., Dasdak, P. & James, T. Y. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 1-16.

- Stuart, S. N., Chanson, J.S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L. & Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783–1786.
- Vieira, C. A., Toledo, L. F., Longcore, J. E. & Longcore, J. R. 2013. Body length of *Hylodes* cf. *ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. *Brazilian Journal of Biology*, 73: 195-199.
- Vredenburg, V. T., Knapp, R. A., Tunstall, T. S. & Briggs, C. J. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 9689-9694.
- Wake, D. B. & Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 11466-11473.
- Walker, S. F., Bosch, J., Gomez, V., Garner, T. W., Cunningham, A. A., Schmeller, D. S. & Fisher, M. C. 2010. Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13: 372-382.

**Table 1.** Data from *Batrachochytrium dendrobatidis* elevation and respective isolated strains, strain's mean zoospore and zoosporangia size with standard deviation represented below minimum - maximum values, prevalence, mean infection load with standard deviation below minimum - maximum values, and the zoospore number on the last day (day 9) of the growth rate. The host species were tadpoles of *Hylodes phyllodes*, and the strain's lineages classified as *Bd*-GPL2.

<b>Elevation (m)</b>	<b>Strain</b>	<b>Prevalence (%)</b>	<b>Infection load (zoospore number)</b>	<b>Zoospore size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Zoosporangia size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Growth rate (zoospore number <math>\times 10^7</math>)</b>
200-300	CLFT 034-00	63.64	691.88 $\pm$ 1.256.19	4.37 $\pm$ 0.91	24.42 $\pm$ 8.00	3.9 $\pm$ 5
			1.68-3330.08	2.69-6.34	14.09-45.05	3.2-4.5
300-400	CLFT 033-00	80.00	959.17 $\pm$ 2.072.52	3.56 $\pm$ 0.67	16.18 $\pm$ 3.01	1.0 $\pm$ 3
			5.58-6633.34	2.01-5.03	10.94-26.52	6-1.3
400-500	CLFT 031-00	58.97	99.29 $\pm$ 325.28	4.08 $\pm$ 0.67	22.29 $\pm$ 4.96	11.2 $\pm$ 2.1
			1.32-1543.71	2.84-5.54	14.73-38.58	9.1-13.3
500-600	CLFT 030-00	58.33	257.29 $\pm$ 996.99	3.87 $\pm$ 0.63	21.54 $\pm$ 6.06	2.2 $\pm$ 3
			1.05-581.66	2.90-5.24	10.80-35.76	1.7-2.6
600-700	CLFT 032-00	87.50	799.75 $\pm$ 1.887.82	2.85 $\pm$ 0.95	15.06 $\pm$ 3.14	4.2 $\pm$ 2.0
			10.37-6933.59	1.30-4.05	10.38-27.82	2.8-7.2

## Figure legends

**Figure 1.** Association between mean zoospore and mean zoosporangia size of the five *Batrachochytrium dendrobatidis* strains isolated from an elevational range defined in the Brazilian Atlantic forest.

**Figure 2.** Associations between morphological and epidemiological variables: mean zoospore size and mean infection load (A), mean zoosporangia size and mean infection load (B), mean zoospore size and prevalence (C) and mean zoosporangia size and prevalence (D).

**Figure 3.** Representative scheme of all the analyzed variables: Mean zoospore size, mean zoosporangia size, prevalence, mean infection load, growth rate at the last day (day 9) and elevation. The black lines represent the significant associations.

**Figure 4.** Growth curves of the five strains, measured in quadruplicate by the mean number of released zoospores in a constant temperature.

**Figure 5.** Association between *Size Index* and *Infection Index*, with the equation that were developed using both indexes.

Figure 1

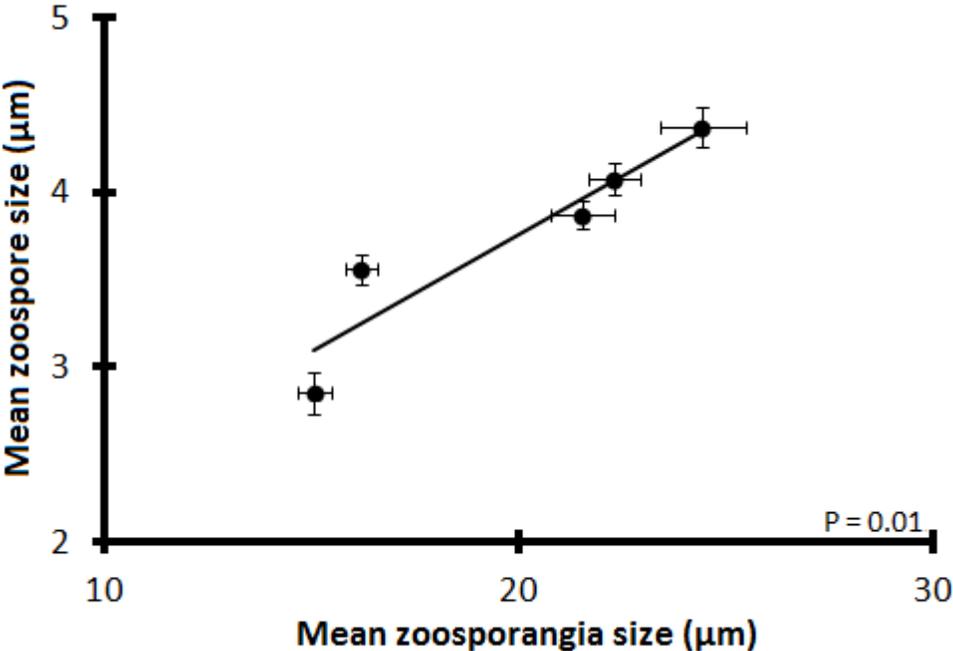


Figure 2

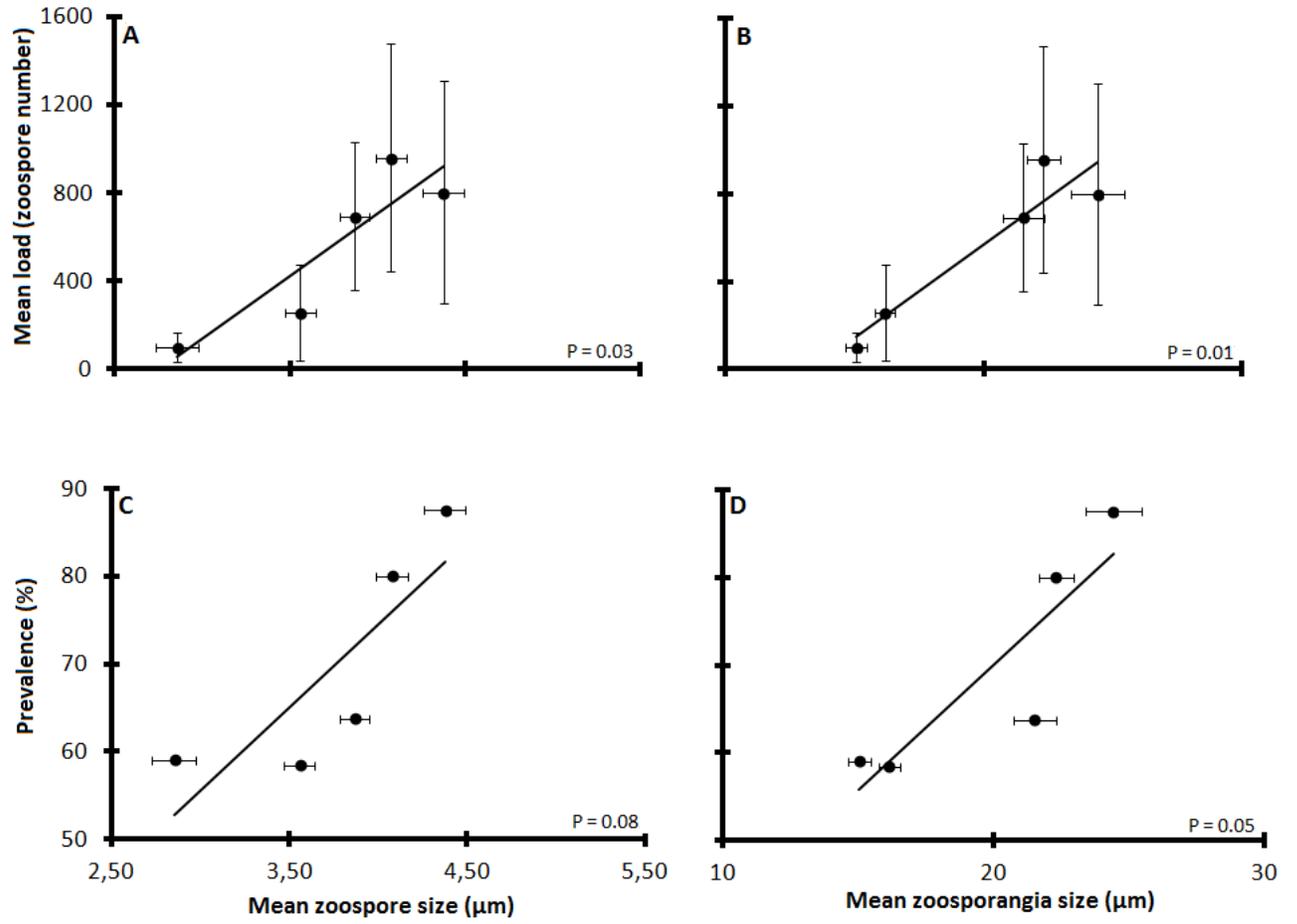


Figure 3

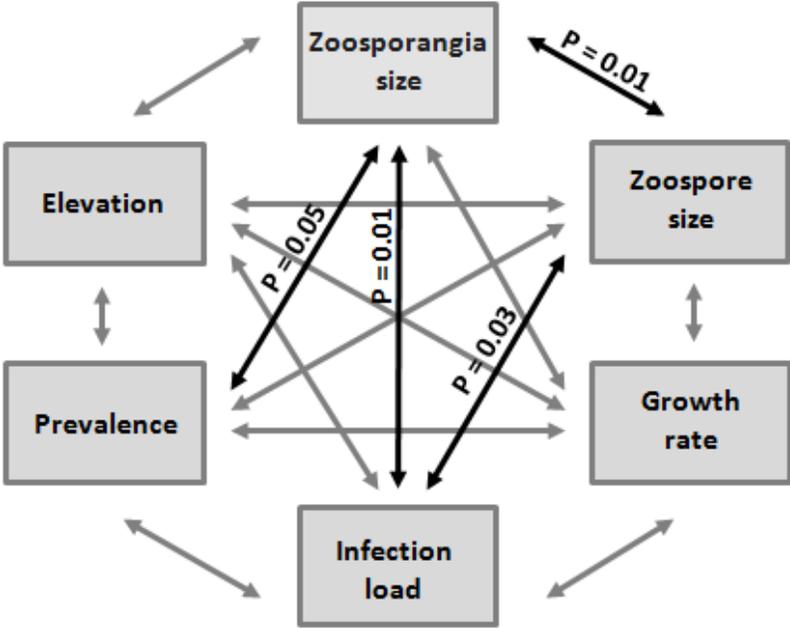


Figure 4

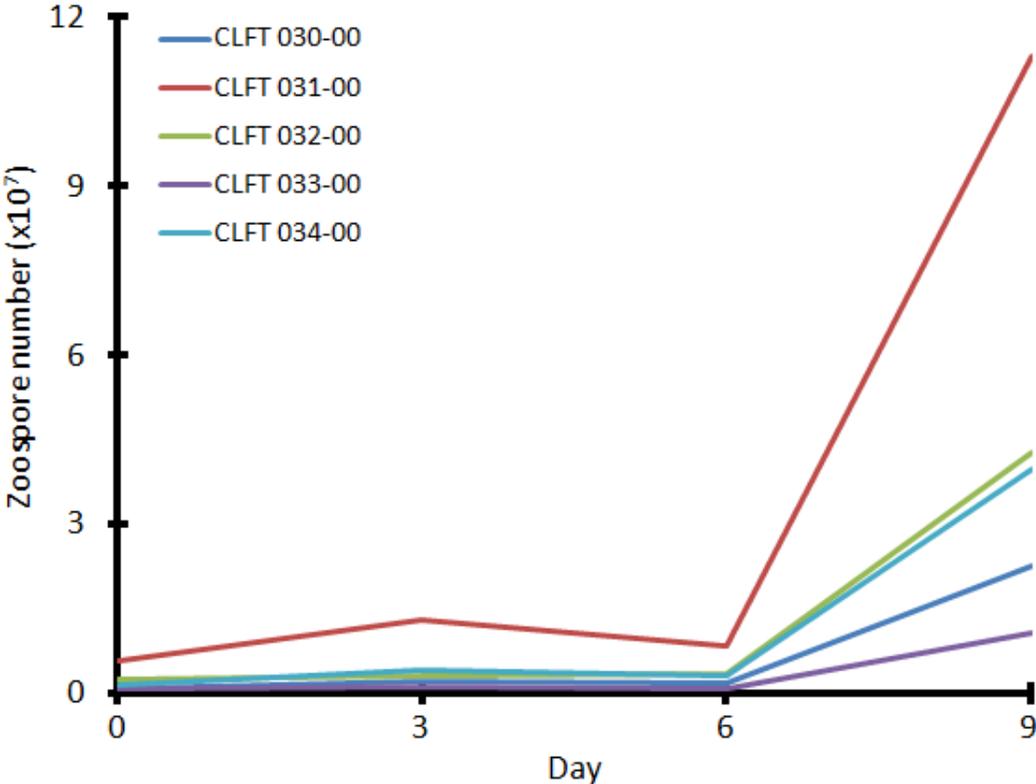
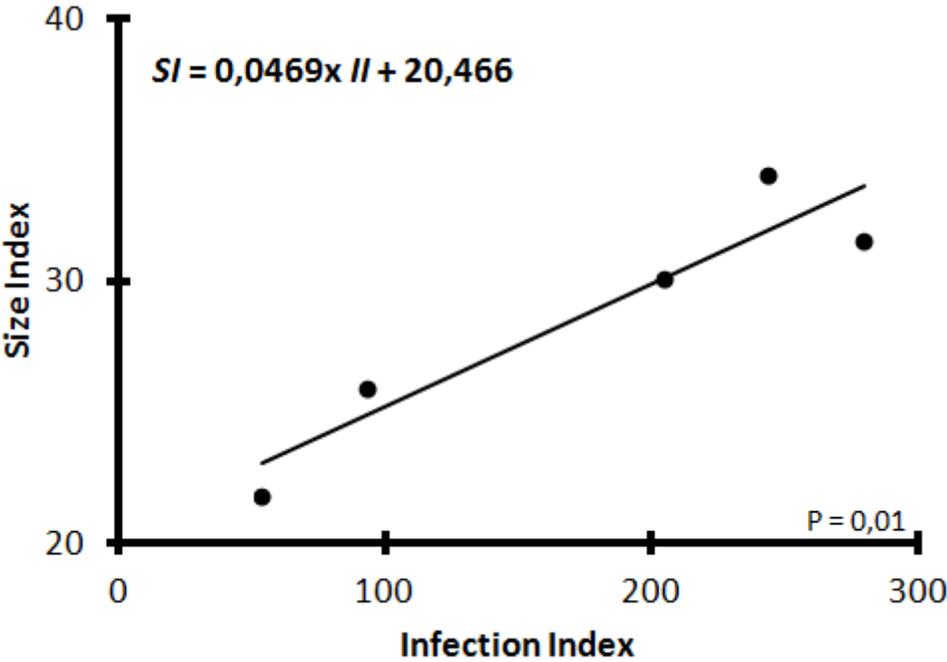


Figure 5





Appendix

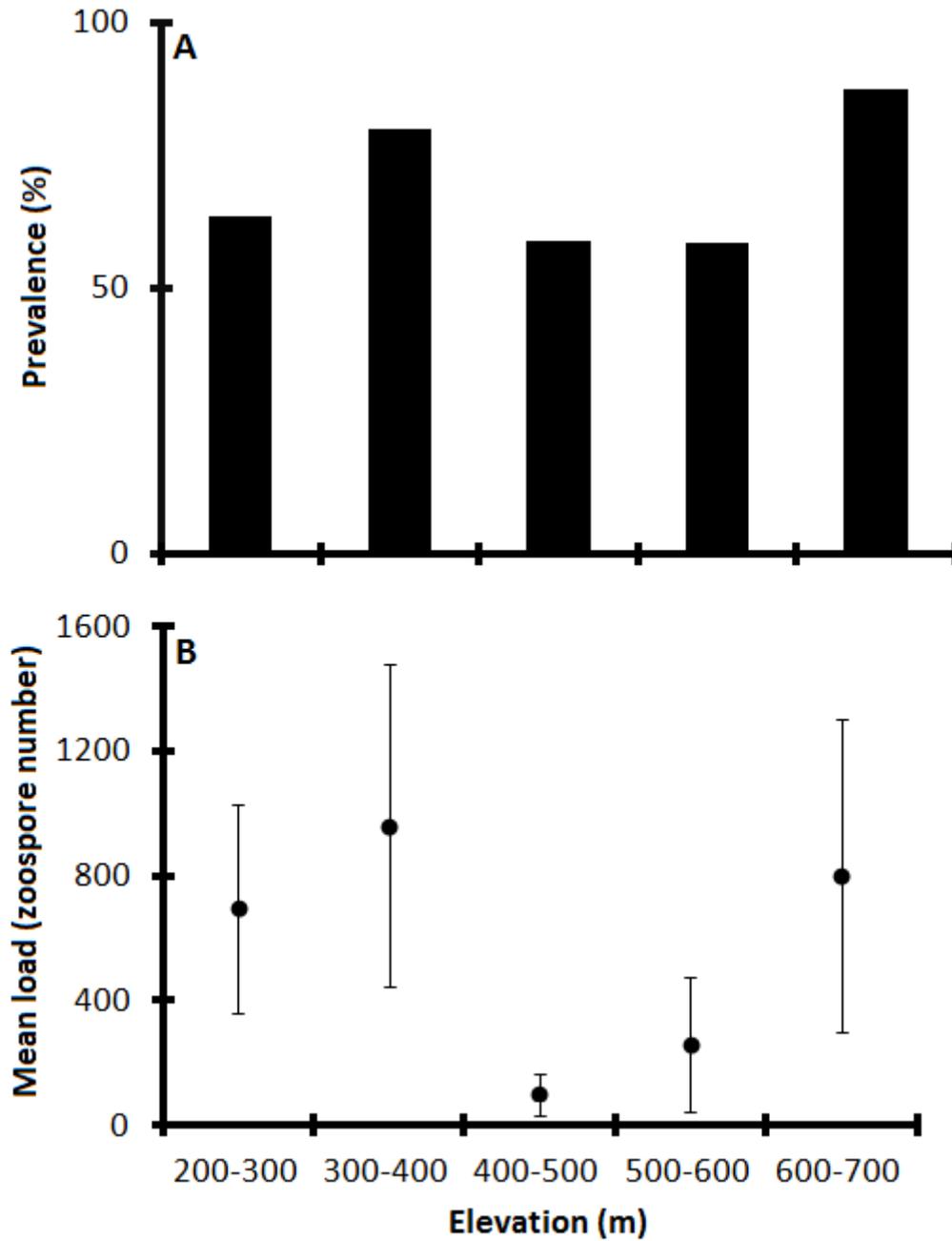
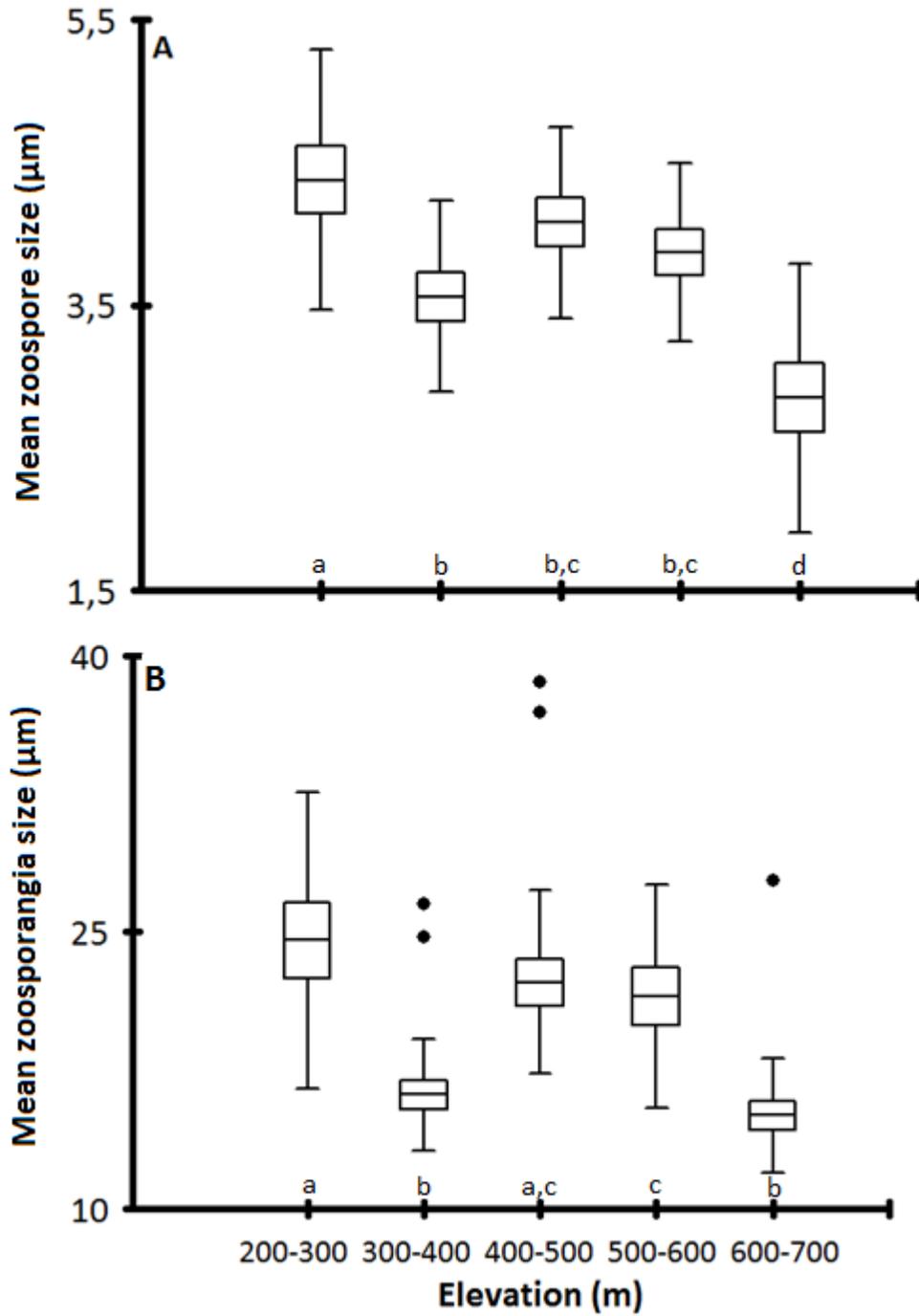
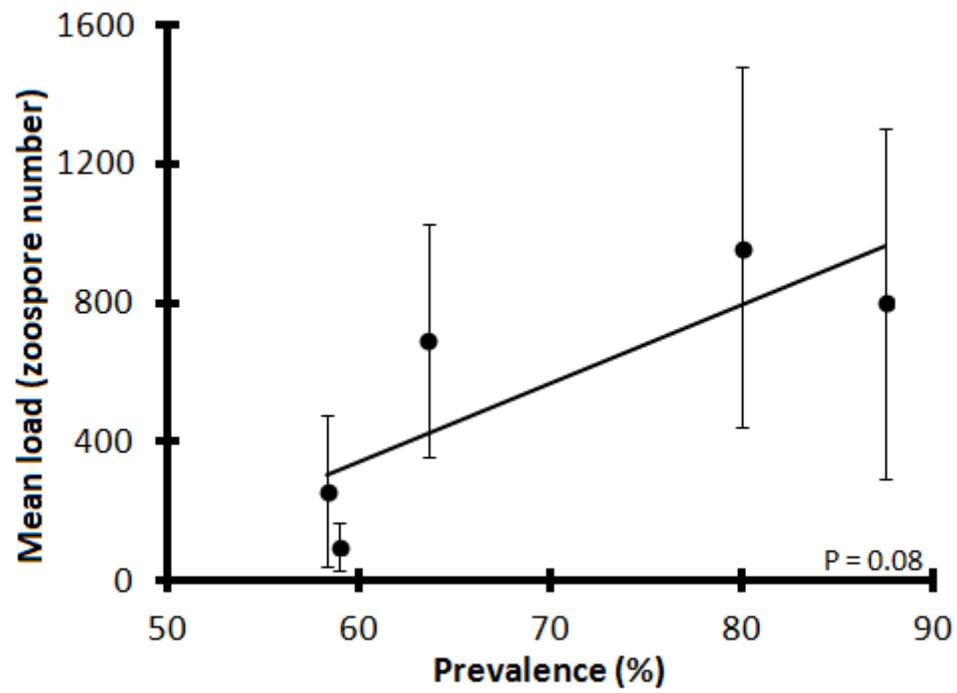


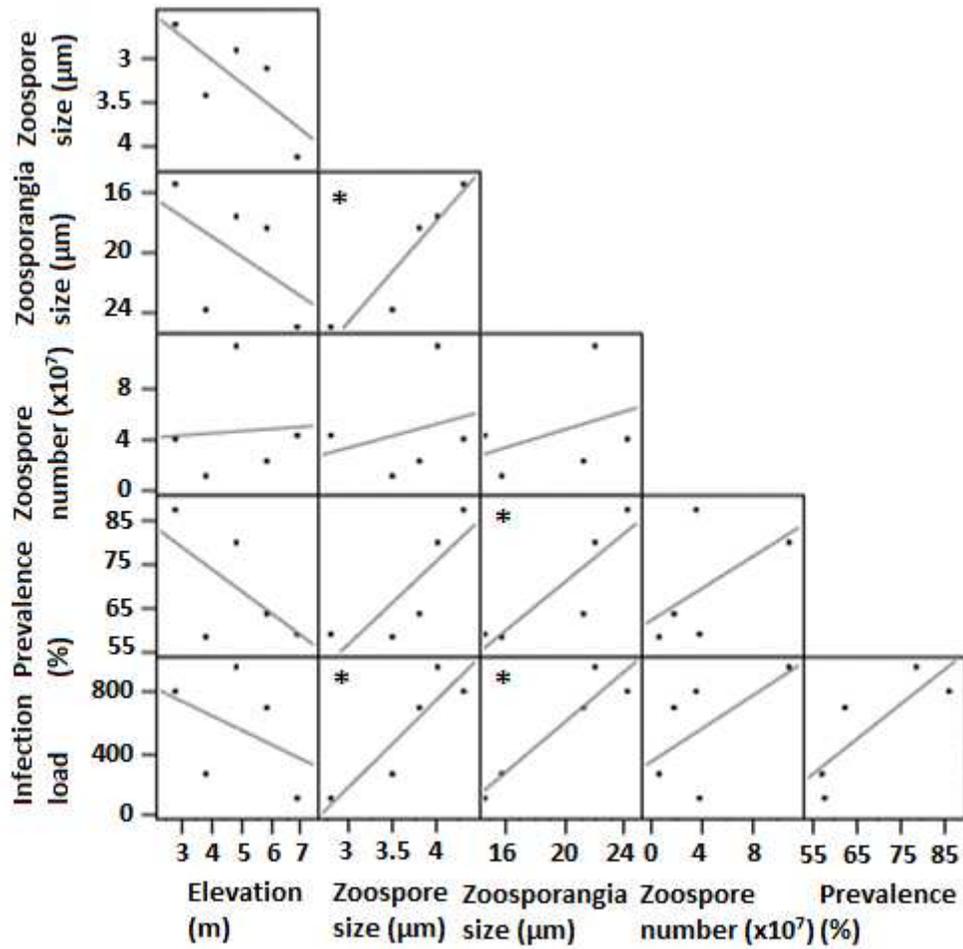
Figure S1. *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence (A) and mean infection load (B) in relation to the elevational range.



**Figure S2.** Zoospore mean size (A) and zoosporangia mean size (B) variation in relation to the elevational range. The letters represent the differences in size among the strains.



**Figure S3.** Linear regression between prevalence and mean infection load data from the elevational range.



**Figure S4.** Linear fit among all the analysed variables: mean zoospore and zoosporangia size, prevalence, mean infection load (zoospore number), mean zoospore number at last day of the growth rate (day 9), and its associations with elevation. \*Represent significant relations.

## SÍNTESE GERAL

Estudos que buscam compreender a dinâmica da quitridiomycose na natureza são importantes e vem sendo cada vez mais desenvolvidos. Existem diversos estudos que reconhecem os fatores que influenciam na dinâmica da doença na natureza, porém poucos buscaram compreender as associações entre esses fatores no intuito de melhorar o entendimento da ação dessa doença na natureza, e esse foi o objetivo principal do presente trabalho.

Apresentamos aqui dados inéditos, em relação às associações existentes entre tais fatores que exercem influência na dinâmica de infecção pelo *Bd* na Mata Atlântica, como a relação entre tamanho dos zoósporos e zoosporângios, assim como as associações encontradas entre o tamanho das cepas, prevalência e intensidade de infecção. Ambas as relações foram encontradas provavelmente pelo controle de determinadas variáveis como a utilização da mesma espécie de hospedeiro, na mesma região geográfica e habitat, que poderiam influenciar nos resultados obtidos, portanto, ressaltamos a importância de se controlar determinadas variáveis para que estudos realizados com o intuito de compreender a relação de fatores que influenciam na dinâmica da doença possam ser comparativos e mais conclusivos.

Ainda nesse sentido, as associações encontradas entre as variáveis morfológicas e epidemiológicas são importantes. Com o desenvolvimento dos índices de tamanho e infecção, é possível realizar a identificação de áreas nas quais o fungo pode ser potencialmente mais patogênico através de análises morfométricas, já que é uma alternativa que exige um número menor de coleta de indivíduos e permite a análise do fungo em si, sem a necessidade de se analisar diversos fatores extrínsecos ao *Bd*.

Existem poucos estudos sobre o fenótipo do *Bd*, e o presente estudo contribui para o entendimento dos altos índices de variação fenotípica que cepas de *Bd* apresentam e, além disso, foi sugerido que o entendimento do fenótipo do *Bd* e suas relações com a epidemiologia da quitridiomiose pode ser a chave para estudos de evolução do *Bd* em micro e macro-escalas.

Também ressaltamos a importância de uma análise mais profunda no que diz respeito aos fatores relacionados à elevação, que podem influenciar a dinâmica da doença. Realizamos uma análise em um gradiente de elevação e, pela primeira vez, fatores que podem interferir nos resultados como diferentes espécies de hospedeiros e diferentes habitats foram controlados. Mesmo com o controle dessas variáveis, não encontramos uma associação entre elevação, prevalência e intensidade de infecção.

Alguns estudos defendem a ideia de que fatores relacionados a altitudes mais elevadas contribuem para um melhor desenvolvimento do fungo, e nessas regiões os efeitos da quitridiomiose são mais potentes. Porém em baixas altitudes também foi detectado altas taxas de prevalência e intensidade de infecção, fato que refuta a hipótese de que apenas em altitudes elevadas os efeitos da doença são mais graves. Portanto, estudos mais específicos devem ser realizados no intuito de verificar se essas relações de fato existem.

Este trabalho abre oportunidades para a realização de outros trabalhos como: 1) Caracterização de áreas críticas nas quais o *Bd* é potencialmente mais patogênico, através do uso dos índices que desenvolvemos; 2) Caracterização fenotípica de cepas de *Bd*, já que o entendimento da variação fenotípica é considerado uma chave nos estudos de macro e micro-evolução do *Bd*; 3) Estudos mais aprofundados sobre os fatores relacionados à elevação, que podem influenciar a dinâmica da quitridiomiose e que ainda não estão bem entendidos.

Portanto, os resultados obtidos com o presente estudo contribuem para o melhor entendimento da dinâmica de infecção pelo *Bd* na Mata Atlântica, que possui a maior riqueza de anfíbios do mundo, e para o desenvolvimento de planos de conservação para os anfíbios não só do Brasil, mas como em todo o mundo.

# ANEXO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 26972-1</b>	<b>Data da Emissão: 08/08/2011 16:51</b>
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Carolina Lambertini	CPF: 360.051.528-40
Título do Projeto: Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie <i>Hylodes phyllodes</i> (Hylodidae) pelo fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de espécimes em campo	10/2011	09/2013
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

### Outras ressalvas

1	Peço a gentileza de prestar atenção na ressalva de nº6 e para a indução de morte dos exemplares, a solicitante, e respectiva equipe, deverão utilizar preferencialmente métodos recomendados pela Resolução nº 714/2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária e/ou da American Society of Ichthyologists and Herpetologist.
---	--

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Domingos da Silva Leite	Orientador de pesquisa	016.488.478-54	9161567-7 SSP-SP	
2	Conrado Augusto Vieira	Auxiliar de Campo e pesquisa	080.393.186-70	12635827 SSP-MG	
3	Afonso Villasanti Pereira	Auxiliar de Campo e pesquisa	337.789.098-00	461005700 ssp-SP	

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BIRITIBA-MIRIM	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Itutinga PIApes)	Fora de UC
2	BERTIOGA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Itutinga PIApes)	Fora de UC
3	UBATUBA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Santa Virgá-nia)	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 89376448**



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26972-1	Data da Emissão: 08/08/2011 16:51
-----------------	-----------------------------------

<b>Dados do titular</b>	
Nome: Carolina Lambertini	CPF: 360.051.528-40
Título do Projeto: Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie <i>Hylodes phyllodes</i> (Hylodidae) pelo fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

4	UBATUBA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Picinguaba)	Fora de UC
5	CARAGUATATUBA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Caraguatuba)	Fora de UC
6	NATIVIDADE DA SERRA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Santa VirgA-nia)	Fora de UC
7	SÃO LUIS DO PARAITINGA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Santa VirgA-nia)	Fora de UC
8	CUNHA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Santa Virginia)	Fora de UC
9	CUNHA	SP	Parque Estadual Serra do Mar (Cunha)	Fora de UC
10	SÃO SEBASTIAO	SP	Parque Estadual Serra do Mar (SAÉo SebastiÃO)	Fora de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Hylodidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Hylodidae
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hylodidae (*Qtde: 6)

\* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas(Material genA/Aléico por swab)
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual de Campinas	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 89376448**



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 26972-1</b>	<b>Data da Emissão: 08/08/2011 16:51</b>
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Carolina Lambertini	CPF: 360.051.528-40
Título do Projeto: Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie <i>Hylodes phyllodes</i> (Hylodidae) pelo fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 89376448**



Página 3/3



**SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE**  
**INSTITUTO FLORESTAL**

Rua do Horto, 931 – CEP 02377-000 – S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555 [www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

**PROCESSO SMA Nº.** : 260106 - 011.309/ 2011  
**INTERESSADO** : Carolina Lambertini  
**ASSUNTO** : Encaminha o projeto de pesquisa: "Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie *Hylodes phyllodes* ( Hylodidae) pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*".  
**EQUIPE** : Carolina Lambertini, Domingos da Silva Leite e Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.  
**VIGÊNCIA** : Outubro de 2011 a Novembro de 2013.

Carta COTEC nº. 118/2012 D144/2011 Ma

São Paulo, 17 de Julho de 2012.

Senhora  
Carolina Lambertini  
Av. José Paulino, 3497, apto 13A  
CEP: 13.140-000 - Paulínia-SP.  
Tel.: (19) 3521-6273  
[carolbio2009@gmail.com](mailto:carolbio2009@gmail.com)

Em adendo à carta COTEC nº 118/12 de 05/03/12, informamos que o projeto "Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da *Hylodes phyllodes* ( Hylodidae) pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*", constante do processo em referência, de autoria de Carolina Lambertini, Domingos da Silva Leite e Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira, foi aprovado para ser executado, no período Outubro de 2011 a Novembro de 2013., nas seguintes Unidades do Instituto Florestal:

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Itutinga-Pilões  Ao responsável pela Unidade	a) <u>Sede Administrativa:</u> Endereço: Estrada Elias Zazur, km 8, s/nº Cubatão-SP Telefones para informação: (13) 3377-9154 (13) 3361-8250 E-mail: <a href="mailto:pesm.itutingapiloes@gmail.com">pesm.itutingapiloes@gmail.com</a>  Dias e horário de funcionamento: de segunda-feira a sexta-feira das 8h às 17h.  b) <u>Visitação:</u> Endereço: Estrada Elias Zazur, Km 8 s/nº - Cubatão -SP.  Dias e horário de funcionamento: de terça-feira a sexta-feira das 9h às 12h e das 14h às 16h:30. Aos sábados 9h às 12h.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Para minimizar o efeito das coletas destes indivíduos sobre as populações desta espécie, solicita-se que as coletas no interior desta Unidade de Conservação (PESM) sejam realizadas em diversas localidades e não sejam concentradas em poucos dias de coleta. Já existe outro projeto de pesquisa (Carlos Becker) registrado na COTEC que prevê a coleta da mesma espécie nas mesmas localidades, por isso reforço que minha solicitação deve ser obedecida integralmente pelos autores;</li><li>• Com relação à realização do projeto no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Itutinga-Pilões, manifestamo-nos: de acordo com a execução do projeto;</li><li>• Com relação aos resultados do projeto, as informações geradas serão de: média prioridade;</li><li>• Com relação ao planejamento da Unidade, o Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Itutinga-Pilões possui Plano de Manejo;</li><li>• Com relação às atividades previstas pelo projeto: não existe restrição;</li><li>• Necessidade de comunicação prévia da inclusão,</li></ul>



**SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE**  
**INSTITUTO FLORESTAL**

Rua do Horto, 931 – CEP 02377-000 – S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555 [www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

**PROCESSO SMA Nº.** : 260106 - 011.309/ 2011  
**INTERESSADO** : Carolina Lambertini  
**ASSUNTO** : Encaminha o projeto de pesquisa: “Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie *Hylodes phyllodes* ( Hylodidae) pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* ”.  
**EQUIPE** : Carolina Lambertini, Domingos da Silva Leite e Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.  
**VIGÊNCIA** : Outubro de 2011 a Novembro de 2013.

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
		bem como do acompanhamento técnico desta Unidade de Conservação; <ul style="list-style-type: none"><li>• Necessário o informe sobre a população da espécie-alvo e se a mesma não será afetada com a coleta proposta;</li><li>• Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC, devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Itutinga-Pilões, para serem juntados ao acervo da Unidade.</li></ul>
Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba  Ao responsável pela Unidade	a) <u>Sede Administrativa:</u> Endereço: Rua Dr. Esteves da Silva, nº 510 Centro/ Ubatuba-SP. Telefones para informação: (12) 3832-1397 (12) 3832-9011 E-mail: <a href="mailto:pesm.picinguaba@iflorestal.sp.gov.br">pesm.picinguaba@iflorestal.sp.gov.br</a>  Dias e horário de funcionamento: de segunda-feira a sexta-feira das 8h às 17h.  b) <u>Visitação:</u> Endereço: Rodovia BR, nº101, km 08 Bairro de Picinguaba/ Ubatuba-SP CEP: 11.680-000 Caixa Postal 157  Dias e horário de funcionamento: de segunda-feira a sexta-feira das 9h às 17h. Trilhas somente com agendamento.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Para minimizar o efeito das coletas destes indivíduos sobre as populações desta espécie, solicita-se que as coletas no interior desta Unidade de Conservação (PESM) sejam realizadas em diversas localidades e não sejam concentradas em poucos dias de coleta. Já existe outro projeto de pesquisa (Carlos Becker) registrado na COTEC que prevê a coleta da mesma espécie nas mesmas localidades, por isso reforço que minha solicitação deve ser obedecida integralmente pelos autores;</li><li>• Com relação à realização do projeto no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, manifestamo-nos: de acordo com a execução do projeto;</li><li>• Com relação aos resultados do projeto, as informações geradas serão de: média prioridade;</li><li>• Com relação ao planejamento da Unidade, o Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba possui: Plano de Manejo;</li><li>• Com relação às atividades previstas pelo projeto: não existe restrição;</li><li>• As seguintes colocações devem ser observadas pelos autores, por ocasião da visita a esta Unidade:</li><li>• O pesquisador deverá apresentar o projeto para a administração do Parque mediante entrevista, primeiramente agendando alojamento e agendar cada visita ao Parque antecipadamente pelo telefone (12) 3832-9011, na secretaria da Sede Administrativa ou pelo e-mail <a href="mailto:pesquisa.picinguaba@gmail.com">pesquisa.picinguaba@gmail.com</a>;</li><li>• A unidade possui alojamento destinado ao programa de pesquisa com capacidade para 08</li></ul>



SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 – CEP 02377-000 – S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555 [www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

**PROCESSO SMA Nº.** : 260106 - 011.309/ 2011  
**INTERESSADO** : Carolina Lambertini  
**ASSUNTO** : Encaminha o projeto de pesquisa: "Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie *Hylodes phyllodes* ( Hylodidae) pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*".  
**EQUIPE** : Carolina Lambertini, Domingos da Silva Leite e Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.  
**VIGÊNCIA** : Outubro de 2011 a Novembro de 2013.

UNIDADE e RESPONSÁVEL	ENDEREÇO DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
		<p>pesquisadores, uma cozinha e um freezer;</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Na primeira visita a campo o pesquisador deverá obrigatoriamente ir acompanhado de um monitor (a ser remunerado pelo pesquisador);</li><li>• Enviar à coordenadoria do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba relatórios periódicos impressos e digital com fotos;</li><li>• Não usar fotos para fins econômicos;</li><li>• No ato da chegada, o pesquisador deverá procurar o Chefe de Equipe de Plantão ou a administração do Parque, que irá encaminhá-lo para o alojamento;</li><li>• Os autores do projeto, durante a realização do trabalho, deverão utilizar os dados das pesquisas para elaborar atividades de ensino, sejam na forma mini-cursos, palestras, apostilas, folhetos, painéis explicativos, para os diferentes grupos que atuam no Parque, a exemplo de outros pesquisadores;</li><li>• Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, para serem juntados ao acervo da Unidade.</li></ul>

*"O projeto se enquadra nas normas estabelecidas pela COTEC.*

*A espécie e o número de indivíduos que os autores pretendem coletar dentro da referida UC é: *Hylodes phyllodes* (seis indivíduos) em diferentes localidades e altitudes (até 1000 metros).*

*A licença expedida pelo SISBIO-IBAMA concede a coleta de seis indivíduos da referida espécie em diversas localidades.*

***Para minimizar o efeito das coletas destes indivíduos sobre as populações desta espécie, solicito que as coletas no interior desta UC (PESM) sejam realizadas em diversas localidades e não sejam concentradas em poucos dias de coleta. Já existe outro projeto de pesquisa (Carlos Becker) registrado na COTEC que prevê a coleta da mesma espécie nas mesmas localidades, por isso reforço que minha solicitação deve ser obedecida integralmente pelos autores.***

*Enviar à COTEC relatório parcial e final.*

*"Ao final do projeto, os autores deverão encaminhar à COTEC uma carta do curador responsável por uma coleção biológica oficial para o depósito dos espécimes, comprovando o tombamento dos indivíduos com os respectivos números de registro."*

Por ocasião das visitas nestas Unidades, solicitamos:



## SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

### INSTITUTO FLORESTAL

Rua do Horto, 931 – CEP 02377-000 – S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555 [www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

**PROCESSO SMA Nº.** : 260106 - 011.309/ 2011  
**INTERESSADO** : Carolina Lambertini  
**ASSUNTO** : Encaminha o projeto de pesquisa: "Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie *Hylodes phyllodes* ( Hylodidae) pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*".  
**EQUIPE** : Carolina Lambertini, Domingos da Silva Leite e Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.  
**VIGÊNCIA** : Outubro de 2011 a Novembro de 2013.

1. Agendar os trabalhos de campo junto à administração da Unidade, com antecedência mínima de 15 dias, fornecendo o nome de todos os membros da equipe visitante;
2. Visitas de pesquisadores, representantes de outras instituições, convidados, pesquisadores estrangeiros, alunos, amigos, fotógrafos, imprensa, etc., não relacionados no projeto original como membro da equipe executora devem ser previamente notificadas e autorizadas pela administração da Unidade;
3. Permitir acompanhamento por pessoal da Unidade, quando o responsável pela Unidade assim estabelecer;
4. Atividades não previstas no projeto original estão vetadas, devendo ser previamente notificadas e submetidas à análise e aprovação do Instituto Florestal;
5. Portar a licença do SISBIO/IBAMA. Quando renovada, apresentar cópia para ser anexada ao processo;
6. Somente os autores nomeados na licença do SISBIO/IBAMA poderão efetuar coletas;
7. Questionários, formulários, entrevistas orais e outras formas de abordagem de pessoal local e do público visitante devem ter o roteiro previamente submetido à ciência do responsável pela administração da Unidade;
8. Atividades de coleta de amostras da biodiversidade estão condicionadas à apresentação de cópia da licença SISBIO/IBAMA. Quando renovada, apresentar cópia para ser anexada ao processo;
9. As intervenções a serem executadas na Unidade, como colocação de placas, pregos, faixas, distribuição de folhetos, etc. devem ser previamente e formalmente autorizadas pelo responsável pela administração da Unidade;
10. Não deixar no campo vestígios da passagem no local como resíduos, buracos, embalagens, armadilhas, tambores, etc. Trincheiras e escavações devem ser seguidas de processos de recuperação, minimizando o dano local;
11. Havendo necessidade de acompanhamento por mateiros, guarda-parques, consultar a Unidade sobre possível disponibilidade, com antecedência mínima de 15 dias e;
12. Havendo necessidade de deslocamento de equipamentos, realizar por conta própria ou consultar a Unidade sobre possível disponibilidade de auxiliares, com antecedência mínima de 15 dias.

Responsáveis por projetos com previsão de coletas devem providenciar a autorização SISBIO/IBAMA na página [http://www.ibama.gov.br/sisbio/index.php?id\\_menu=205](http://www.ibama.gov.br/sisbio/index.php?id_menu=205). Obtida a autorização, encaminhar cópia à Comissão Técnico Científica – COTEC para ser anexado no processo respectivo. A partir de janeiro de 2008, toda e qualquer forma de coleta nas UCs deverá ser formalmente licenciada pelo SISBIO/IBAMA.

Conforme estabelece a Portaria do Diretor Geral de 23/01/90, e certificado à V. Senhoria nos Termos de Compromisso e de Responsabilidade assinados em 16/08/2011, há necessidade de encaminhar à COTEC, um relatório anual, no mês de Dezembro de cada ano. Nos relatórios assinalar a área de estudos em GPS/coordenadas geográficas.

Relatórios parciais e final encaminhados à COTEC devem também ser remetidos à administração das Unidades de Conservação, para serem juntados ao acervo da Unidade.



**SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO FLORESTAL**

Rua do Horto, 931 – CEP 02377-000 – S. Paulo, SP - Brasil - Fone: (0xx11) 2231-8555 [www.iflorestal.sp.gov.br](http://www.iflorestal.sp.gov.br)

**PROCESSO SMA Nº.** : 260106 - 011.309/ 2011  
**INTERESSADO** : Carolina Lambertini  
**ASSUNTO** : Encaminha o projeto de pesquisa: “Influência da altitude na prevalência de infecção em anuros da espécie *Hylodes phyllodes* ( Hyloidae) pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* ”.  
**EQUIPE** : Carolina Lambertini, Domingos da Silva Leite e Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.  
**VIGÊNCIA** : Outubro de 2011 a Novembro de 2013.

Cópia da dissertação, tese, artigos, resumos em eventos científicos e outras formas de publicações podem ser apresentados como relatório parcial e final. Não havendo possibilidade de cópias, solicita-se o encaminhamento da(s) referência(s) bibliográfica(s), que possibilite(m) o acesso a todas as informações geradas no projeto.

A utilização para outros fins que não seja a pesquisa científica, de fotografias, imagens, vídeos e outras mídias registradas nas Unidades a título deste projeto devem ser objetos de termo específico, conforme a Portaria CINP, de 09/02/1999, publicada no DOE de 10/02/1999.

Esta aprovação não implica em suporte financeiro de qualquer natureza por parte do Instituto Florestal. A participação e ou auxílio financeiro por parte do Instituto Florestal, quando houver, deverá ser detalhado e formalizado através de contratos, convênios e outros instrumentos legais pertinentes, cuja cópia deve ser juntada ao presente processo.

Para qualquer informação ou eventualidade, colocamo-nos à sua inteira disposição.

Por prestigiar a nossa instituição, agradecemos.

Atenciosamente,

Israel Luiz de Lima  
COTEC - Comissão Técnico Científica  
Instituto Florestal  
Rua do Horto, nº 931  
02377-000 - São Paulo – SP  
Fone: (011) 2231- 8555 – Ramal 2071 Fax: Ramal 2220  
[cotec@if.sp.gov.br](mailto:cotec@if.sp.gov.br)  
[cotec2@gmail.com](mailto:cotec2@gmail.com)