

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
- UNOCHAPECÓ**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais -
PPGCA**

Roseli Coelho dos Santos

**VARIAÇÃO NA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR
Batrachochytrium dendrobatidis EM POPULAÇÕES DE RÃ-
TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Chapecó – SC, 2018

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
- UNOCHAPECÓ**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais -
PPGCA**

**VARIAÇÃO NA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR
Batrachochytrium dendrobatidis EM POPULAÇÕES DE RÃ-
TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Roseli Coelho dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadoras
Profa. Dra. Elaine Maria Lucas Gonsales
Profa. Dra. Gilza Maria de Souza Franco

Chapecó - SC, fevereiro, 2018

S237v Santos, Roseli Coelho dos
Variação na intensidade de infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* em populações de rã-touro na Região Sul do Brasil./ Roseli Coelho dos Santos. - 2018.
64 p.il.; 21 cm

Orientadora: Elaine Maria Lucas Gonsales
Bibliografia: p. 52-60
Dissertação (Mestrado) - Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Chapecó, 2018.

1. Anfíbio - Espécies. 2. Anuro. 3. Fungos. I. Gonsales, Elaine Maria Lucas. II. Franco, Gilza Maria de Souza. III. Universidade Comunitária da Região de Chapecó. IV. Título.

CDD: 371.1 - 23. ed.



UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
- UNOCHAPECÓ

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - PPGCA

VARIAÇÃO NA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR
Batrachochytrium dendrobatidis EM POPULAÇÕES DE RÃ-
TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Roseli Coelho dos Santos

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Ambientais
sendo aprovado em sua forma final.

Profª Elaine Maria Lucas Gonsales, Dra. em Ecologia
Orientadora

Profª Gilza Maria de Souza Franco, Dra. em Ecologia de Ambientes Aquáticos
Continentais
Co-orientadora

BANCA EXAMINADORA

Profº Alexandro Marques Tozetti, Dr. em Ecologia

Profº Jacir Dal Magro, Dr. em Química

Chapecó, 28 de fevereiro de 2018

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais José M. Coelho (*in memoriam*) e Maria V. Coelho, meus irmãos, meu esposo Valcino e meus filhos Bruno e Raul, razão da minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **CAPES** pelo apoio financeiro, que contribuiu muito em meu trabalho, ao **IBAMA** pela licença da coleta de campo (SISBIO nº 56259-1) e a **SEED/PR** pela licença remunerada para cursar o Mestrado, e permitir o avanço profissional.

Agradeço imensamente a Prof^a Dra. **Elaine Maria Lucas Gonsales** pela orientação, ensinamento, paciência e amizade. Sou imensamente grata por ter me mostrado o maravilhoso mundo dos anfíbios.

A Prof^a Dra. **Gilza Maria de Souza Franco** (UFFS/Realeza), coorientadora, que além de seus ensinamentos, compartilhamos belos momentos em campo, com direito a ouvir suas belas risadas. Incluindo seus alunos de Ciências Biológicas (UFFS/Realeza) **Danieli Fernanda Zanelatto** e **Leonardo Carraro**, o Prof^o Mestre **Ruben Alexandre Boelter** (UFFS/Realeza) e o Doutorando **Rui Márcio Franco** (UNIOESTE/Toledo), que auxiliaram nas coletas de campo.

Ao Prof^o Dr. **Luís Felipe Toledo** (UNICAMP) também coorientador, que muito contribuiu para a conclusão desta pesquisa, ao Dr. **Domingos da Silva Leite** (UNICAMP), as Mestrandas Luisa de Pontes Ribeiro e Mariana Retuci Pontes (UNICAMP), pelo total apoio e pela realização das análises de laboratório. Valeu pela parceria.

A Técnica de Laboratório de Genética (UNOCHAPECÓ), **Flávia Caldeira** e as Mestrandas de Ciências Ambientais **Julia Ernetti** e **Francili Delazeri** que auxiliaram nas análises de laboratório e **Joana Priscilla Boschetti** que me auxiliou nas coletas de campo. Obrigada pelo carinho e amizade.

A Técnica de Laboratório de Ecologia, Mestra **Veluma Ialú Molinari De Bastiani**, obrigada pelas valiosas discussões, ensinamentos, amizade e principalmente pelos bons momentos vividos.

Agradecer a todos os proprietários rurais que gentilmente nos permitiram entrar em suas propriedades e fazer nosso trabalho. Em especial ao senhor **Anselmo Boger** e família (Medianeira/PR), que além de nos receber amigavelmente, ainda ofereceu um “baquete de rãs”.

A todos professores e colegas do curso, pelos bons momentos compartilhados, em especial a **Claudia Giasson** e a **Manoela Getelina** pelas

conversas diárias, principalmente em dias de angústia e desespero. Obrigada pela amizade e companheirismo.

A minha família, por abrir mão de muitos momentos de convivência e me incentivar a continuar a vida acadêmica. A minha mãe **Maria Vieira Coelho** pelas orações e meus irmãos pelo apoio e incentivo.

Agradeço imensamente aos meus filhos: **Bruno Ribeiro dos Santos** que me incentiva a sonhar cada vez mais alto e **Raul Ribeiro dos Santos** que me encanta diariamente com sua alegria. E sou enormemente grata ao meu esposo **Valcino Ribeiro dos Santos**, por simplesmente compartilhar de meus sonhos.

RESUMO

SANTOS, Roseli Coelho. VARIACÃO NA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR *Batrachochytrium dendrobatidis* EM POPULAÇÕES DE RÃ-TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária da Região de Chapecó. 2018, 64 p.

A exótica rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é considerada propagadora do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), causador de quitridiomicosose. A quitridiomicosose é uma doença emergente e relacionada a declínios populacionais e extinções de anfíbios em diversos continentes. No Brasil, o cenário é preocupante devido a elevada diversidade e endemismo de anfíbios e a rápida expansão na ocorrência de populações de rã-touro nos ambientes naturais. Neste estudo, nós analisamos a presença de *Bd* em rã-touro e o papel dos ranários como potencializadores na dispersão de quitridiomicosose para os ambientes naturais. Realizamos o estudo em seis ranários e oito localidades com lagoas naturais no sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. Quantificamos a prevalência e a intensidade de *Bd* em amostras de secreção cutânea de rã-touro, com a técnica de *qPCR*. Encontramos indivíduos infectados por *Bd* em todos os locais amostrados. Registramos alta prevalência e baixa intensidade do fungo. Nos ranários, 72,7% (n = 88) dos indivíduos estavam infectados e nas lagoas, 60,6 % (n = 94). A carga de zoósporos de 5% dos indivíduos foi acima de 10.000. A prevalência de indivíduos infectados não diferiu entre ranários e ambientes naturais, mas entre os ranários, o tipo do manejo foi importante, sendo o manejo com ciclo de vida completo em cativeiro relacionado às menores prevalências. A carga de zoósporos também não diferiu entre indivíduos de ranários e de ambientes naturais, mas variou significativamente entre locais de amostragem. A distância entre os ranários e as lagoas não interferiu na prevalência e carga de zoósporos. As fêmeas apresentaram maiores cargas de zoósporos. Nas lagoas, a carga de zoósporos foi influenciada pela temperatura da água e nos ranários, pela temperatura da água, temperatura do ar e pH. Embora os ranários parecem não influenciar na prevalência ou carga de zoósporos de indivíduos que vivem em lagoas próximas, eles podem estar atuando como fonte constante de entrada de indivíduos e patógenos para os ambientes naturais, especialmente em estabelecimentos com manejo aberto, ou seja, quando parte do ciclo de vida ocorre fora do cativeiro. Neste sentido, é fundamental e urgente a adoção de medidas de monitoramento, manejo e controle de ranários na região sul do Brasil.

Palavras-chaves: Conservação biológica, Doenças emergentes, Espécie exótica invasora, Anfíbios, Mata Atlântica.

ABSTRACT

SANTOS, Roseli Coelho. VARIATION IN THE INTENSITY OF *Batrachochytrium dendrobatidis* INFECTION IN BULLFROG POPULATIONS, IN SOUTHERN BRAZIL. Dissertation (Master degree). Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária da Região de Chapecó. 2018, 64 p.

The bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is an invasive species and propagator of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) that causes chytridiomycosis, an emerging disease related to population declines and extinctions of amphibians in several continents. In Brazil, the situation is worrying due to the high diversity and endemism of amphibians and the rapid expansion in the occurrence of bullfrog populations in natural environments. In this study, we analyzed the presence of *Bd* in bullfrog and the role of frog farms as potentiators in the dispersion of chytridiomycosis to natural environments. We realized the study in six frog farms and eight sites with natural ponds in southern Brazil, from September 2016 to May 2017. We quantified the prevalence and intensity of *Bd* in cutaneous secretions of bullfrog, using *qPCR*. We found individuals infected with *Bd* at all sites. We recorded high prevalence and low intensity of the fungus. In the frog farms, 72.7% (n = 88) of the individuals were infected and in the ponds just 60.6% (n = 94). The zoospore load of 5% of individuals was above 10,000. The prevalence of infected individuals did not differ between the sites, but among the frog farms, the type of management was important, and the management in captivity is related to lower prevalences. The zoospores load also did not differ between frog farms and the natural environments, but they varied significantly between the sampling sites. The distance between the frog farms and the ponds did not interfere with the prevalence and load of zoospores. Females presented higher zoospore loads. In ponds, the load of zoospores was influenced by the water temperature, in the frog farms by the water temperature, air temperature and pH. Although frog farms do not appear to influence in the prevalence or load of zoospores, they may be acting as a constant source of input from individuals and pathogens to natural environments, especially in establishments with open management, with part of the life cycle out of captivity. In this sense, it is fundamental and urgent to adopt frog farms measures of monitoring, management and control, in the southern region of Brazil.

Keywords: Biological conservation, Emerging diseases, Invasive exotic species, Amphibians, Atlantic rainforest.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL:

Figura 1. Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* na fase independente de substrato, apresentando o estágio de vida em que os zoósporos são flagelados, móveis e de vida livre. Na fase do ciclo de vida dependente de substrato, o zoósporo encistado se desenvolve dentro de zoosporângios, onde produz e libera novos zoósporos. Fonte: ROSENBLUM et al., 2008)16

CAPÍTULO I - ELEVADA PREVALÊNCIA E BAIXA INTENSIDADE DE INFECÇÃO PELO FUNGO QUITRIDIO EM POPULAÇÕES DE RÃ-TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL:

Figura 1. Pontos de amostragem em lagoas naturais (pontos brancos) e ranários (pontos pretos) onde indivíduos de *Lithobates catesbeianus* foram amostrados para prevalência e carga de *Batrachochytrium dendrobatidis* nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil. 1 = Medianeira; 2 = Santa Izabel do Oeste; 3 = Sulina; 4 e 5 = Chapecó; 6 = Guatambu; 7 = São Domingos; 8 = São Lourenço do Oeste.....44

Figura 2. Prevalência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em ranários e ambiente natural (A) e em relação ao tipo de manejo (“aberto” ou “fechado”) em seis ranários (B). Variação na carga de zoósporos (em *log*) de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro, por ambiente de amostragem (C) e por localidade de coleta (D), na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. A descrição das abreviações das localidades amostradas se encontram na Tabela 1.....45

Figura 3. Prevalência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro de lagoas naturais, em relação à distância de ranários (A), e variação na carga de zoósporos (em *log*) em relação à distância de ranários (B) localizados nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017.....45

Figura 4. Variação na carga de zoósporos (em *log*) de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em relação ao sexo (A), faixa etária (B), variação no Índice de Massa Corporal (IMC) em relação à carga de zoósporos (em *log*) (C) e Índice de Massa Corporal (IMC) em relação à presença de zoósporos (D), em ambientes naturais nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017.....46

Figura S1. Lagoas em ambientes naturais e ranários com amostragem do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro nos estados do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil. Medianeira/PR (A e C), Chapecó/SC (D e E), Guatambu/SC (B e F), São Domingos/SC (G e H) e São Lourenço do Oeste/SC (I e J)61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - ALTA PREVALÊNCIA E BAIXA INTENSIDADE DE INFECÇÃO PELO FUNGO QUITRIDIO EM POPULAÇÕES DE RÃ-TOURO NA REGIÃO SUL DO BRASIL:

Tabela 1. Localidades de amostragem de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. Os locais estão identificados por RA = Ranário; LA = Lagoa natural; Profundidade = altura média da coluna d'água das baías e das lagoas; Vegetação = vegetação predominante nas margens das lagoas.....36

Tabela 2. Carga de zoósporos e prevalência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em ranários e ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. RA = ranário; LA = lagoa em ambiente natural. A carga de zoósporos está representada como média \pm desvio padrão e amplitude. A prevalência é apresentada como porcentagem (indivíduos positivos/indivíduos amostrados).....42

Tabela 3. Número de indivíduos positivos para *Bd*, intervalo da carga de zoósporos e porcentagem (indivíduos positivos por intervalo/indivíduos positivos), em rã-touro em ranários e ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017.....43

Tabela 4. Influência de variáveis ambientais sobre a carga de zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis*, em rã-touro em ranários e ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. F = valores da regressão linear múltipla; Valores de P significativos ($\leq 0,05$) estão indicados em negrito.....43

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO I - ALTA PREVELÊNCIA E BAIXA INTENSIDADE DE INFECÇÃO PELO FUNGO QUITRIDIO EM POPULAÇÕES DE RÃ-TOURO NA MATA ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL	29
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	31
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Área de Estudo	34
2.2 Coleta de dados.....	38
2.3 Análise de dados.....	40
3 RESULTADOS.....	41
4 DISCUSSÃO	46
AGRADECIMENTOS	52
REFERÊNCIAS.....	52
MATERIAL SUPLEMENTAR 1.....	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS.....	63

INTRODUÇÃO GERAL

Na segunda metade do século XX, iniciou um rápido e crescente declínio em populações de anfíbios em diversas regiões do mundo (STUART et al., 2004). Atualmente, cerca de 41% de todas as espécies se encontram ameaçadas (MONASTERSKY, 2014), sendo o grupo de vertebrados mais ameaçado de extinção (KILPATRICK et al., 2010; LAMBERTINI et al., 2013; MONASTERSKY, 2014). Desde a década de 1990 (WAKE, 1991; HAYES et al., 2010), os registros de declínios populacionais tem sido associados a fatores como perda e alteração de habitat, mudanças climáticas, contaminação química, doenças infecciosas e introdução de espécies exóticas (WAKE; VREDENBURG, 2008). Esses fatores podem atuar em sinergia, acelerando os declínios e as extinções (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; CARNAVAL et al., 2006; ROCHA et al., 2006; WAKE; VREDENBURG, 2008). A associação de dois ou mais fatores podem gerar estresse fisiológico e reduzir a imunidade dos anfíbios, facilitando a ocorrência de infecções por agentes patogênicos (SCHAR et al., 2004; HAYES et al., 2010).

A invasão de espécies exóticas é observada em praticamente todos os ecossistemas, sendo considerada a segunda maior causa de perda de biodiversidade no mundo (BELLARD et al., 2012; 2014). As espécies exóticas afetam química, física e biologicamente os ambientes naturais, promovendo degradação e alterações na estrutura e funcionamento dos ecossistemas (PYSEK; RICHARDSON, 2010). A introdução de espécies exóticas pode ser de origem acidental ou intencional, com objetivo de controle biológico, alimentação, estética ou entretenimento (TINGLEY et al., 2010; KUMSCHICK; RICHARDSON, 2013). No entanto, o sucesso do estabelecimento da espécie na nova região depende da sua habilidade para sobreviver, reproduzir, dispersar e interagir com as espécies na comunidade local (PYSEK; RICHARDSON, 2012). Para ser considerada invasora, uma espécie deve passar por um processo complexo que envolve a sequência de quatro estágios (GARCÍA-BERTHOU, 2007; BLACKBURN et al., 2011). O primeiro é o transporte do local de origem para a nova área, o segundo é a liberação para o ambiente natural de forma intencional ou acidental, o terceiro é o estabelecimento da espécie na nova área e o quarto estágio é caracterizado pela disseminação no ambiente invadido (TINGLEY et al., 2010). Assim, as espécies exóticas se tornam

invasoras, com registro de populações que se mantêm ao longo de vários ciclos de vida, com período reprodutivo definido, aumento populacional, com indivíduos espalhados em regiões distantes do local de introdução, demonstrando um eficiente potencial de dispersão no ambiente natural (RICHARDSON et al., 2000; OCCHIPINTI-AMBROGI; GALIL, 2004; PYSEK et al., 2004).

No Brasil, o número de espécies exóticas de anfíbios aumentou nos últimos anos (FORTI et al., 2017), assim como para outros grupos de vertebrados (ROSA et al., 2017). Independentemente da forma de introdução, os registros indicam que as populações de anfíbios e também as áreas de ocorrência estão ampliando ao longo dos anos (BOTH et al., 2011; FORTI et al., 2017), devido principalmente à liberação intencional ou fuga de criadouros (ROSA et al., 2017). Das seis espécies exóticas invasoras de anfíbios no Brasil, a rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, é considerada a principal (FORTI et al., 2017). Da mesma forma, a rã-touro é considerada a pior espécie de anfíbio invasor do mundo (LOWE et al., 2000; GISD, 2018). Sua distribuição original é o Leste da América do Norte, mas atualmente encontra-se estabelecida em diversos continentes, incluindo a América do Sul (LUTZ et al., 1999; NORI et al., 2011), onde está amplamente distribuída em diversos países (NORI et al., 2011; LAUFER; GOBER et al., 2017; QUIROGA et al., 2015). No Brasil, a introdução de rã-touro ocorreu em 1935 no Rio de Janeiro, pelo canadense Tom Carryl Harrison, que trouxe do Canadá 300 casais, dando início ao primeiro ranário, na Baixada Fluminense (LONGO, 1987; CUNHA; DELARIVA, 2009; BOTH et al., 2011). A finalidade foi a criação e comercialização (VIZOTTO, 1984; MADALOZZO, 2016), cuja expansão se deu na década de 1980, seguida por um desestímulo e fechamento de estabelecimentos, devido às precárias condições de instalações e dificuldades nas técnicas de manejo (FEIX et al., 2004). Porém, na última década tem havido uma nova expansão da criação e comercialização (CRIBB et al., 2013), colocando o Brasil na condição de maior produtor de rã-touro em sistema intensivo do mundo (AFONSO, 2012). Em ambientes naturais, em 2011 a ocorrência desta espécie invasora já havia sido registrada em 130 municípios brasileiros, sendo 62% no sul, 25% no sudeste, nove na região nordeste, sete no meio-oeste e um único registro na região norte (BOTH et al., 2011). Possivelmente, o número de registros conhecidos já deve estar superado, com novas solturas e progressivo estabelecimento da espécie em novas áreas (LOYOLA et al., 2012). A ampla

distribuição de rã-touro no domínio do bioma Mata Atlântica evidencia a sua elevada capacidade de dispersão, adaptação e estabelecimento em regiões de clima subtropical (BOTH et al., 2011).

Na região sul do Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontava um total de 91 ranários em 2006 e em torno de 16 em 2013 (MORETTO et al., 2013). No estado de Santa Catarina, a atividade se estabeleceu em diversas regiões, mas atualmente, a maioria dos ranários está localizada na região leste, com instalações climatizadas e a produção voltada aos mercados interno e externo (MORETTO et al., 2013). É muito provável que, com a desativação de ranários, muitos animais tenham sido deliberadamente soltos nas imediações, propiciando a dispersão da espécie nos ambientes naturais e impactando negativamente as populações de anfíbios nativos (BOTH et al., 2014). Desta forma, a ranicultura, com ciclos de atividades flutuantes, contribuiu para o estabelecimento e rápida ampliação de populações desta espécie invasora nos ambientes naturais em diversas regiões do sul do Brasil (BORGES-MARTINS et al., 2002; TOLEDO et al., 2006; BOTH et al., 2011; INSTITUTO HÓRUS, 2017), tanto em áreas de Mata Atlântica como de Pampa (GIOVANELLI et al., 2008; BOTH et al., 2011). Nesta região, existem registros de populações estabelecidas tanto em áreas abertas como florestais (MADALOZZO et al., 2016), incluindo unidades de conservação (FATMA, 2007; ALVES et al., 2008; BOTH et al., 2011; LUCAS; MAROCCO, 2011; BASTIANI; LUCAS, 2013; MADALOZZO et al., 2016), representando um grande desafio para a conservação e gestão de áreas legalmente protegidas.

Além da alta capacidade de dispersão nos ambientes naturais, a rã-touro possui maturidade sexual precoce, alta taxa de fecundidade e período de reprodução ampliado (KAEFER et al., 2007; MEDEIROS et al., 2016), resultando em maior densidade populacional. Esta espécie também demonstra grande tolerância e habilidade frente às atividades antrópicas que causam degradação ambiental, resultando em vantagem sobre as espécies nativas, devido a capacidade para permanecer em habitat degradado (HAYES et al., 2010; D'AMORE et al., 2010). Nos ambientes naturais, a coocorrência com espécies nativas de anfíbios (LUCAS; FORTES, 2008; LUCAS; MARROCO, 2011), resulta em impactos como a competição e a predação, e conseqüentemente, em desequilíbrios e perturbações nas comunidades (KUPFERBERG, 1997; KIESECKER; BLAUSTEIN, 1997;

HANSELMANN et al., 2004), devido ao seu tamanho corporal, hábito generalista (LOWE et al., 2000; NENTWIG et al., 2007) e atividade de vocalização (MEDEIROS et al., 2016). Os juvenis são encontrados em ambientes lênticos, podendo se deslocar entre as áreas úmidas, enquanto os adultos são encontrados tanto em ambientes lênticos quanto lóticos, onde também permanecem durante boa parte do seu ciclo reprodutivo (SEPULVEDA et al., 2015). A rã-touro pode atuar como propagadora de duas doenças, a quitridiomiose e o ranavírus, que estão associados a declínios e extinções locais de anfíbios, mesmo em áreas preservadas (SCHLOEGEL et al., 2009). Dessa forma, muitos estudos sugerem que a presença de rã-touro nos ambientes naturais representa uma dupla ameaça às populações de espécies nativas (KATS; FERRER, 2003; HANSELMANN et al., 2004).

A quitridiomiose é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (SKERRATT et al., 2007; CRAWFORD et al., 2010; SCHLOEGEL et al., 2006, 2012), que pertence ao filo Chytridiomycota. Esta doença vem sendo considerada uma importante causa de declínios populacionais e extinções de anfíbios nativos em algumas regiões do mundo (BERGER et al., 1998; LIPS, 1999; DASZAK et al., 2003; STUART et al., 2004). Sua ocorrência é registrada em todos os continentes, exceto na Antártica (OLSON et al., 2013). A sua origem ainda é incerta, pois pesquisas realizadas com exemplares de anfíbios depositados em museus demonstraram que o fungo já estava presente na Mata Atlântica brasileira em 1894 (RODRIGUEZ et al., 2014), na região central dos Estados Unidos (USA) em 1888 (TALLEY et al., 2015) e na África em 1938 (JAMES et al., 2015).

O fungo *Bd* é saprófita, adaptado a ambientes aquáticos de água doce e apresenta zoósporo móvel e flagelado (BARR, 1990; MITCHELL et al., 2007; FISCHER et al., 2009). O seu desenvolvimento ocorre dentro das células queratinizadas dos anfíbios (FISCHER et al., 2009) e, no ambiente, os esporângios (cistos) garantem a sobrevivência até que as condições do ambiente sejam favoráveis (DI ROSA et al., 2007; MITCHELL et al., 2007). O *Bd* apresenta duas fases em seu ciclo de vida, uma fase independente e a outra dependente do substrato (BERGER et al., 2005). A fase dependente do substrato inicia-se na epiderme dos anfíbios (ROSENBLUM et al., 2008), após sua colonização, o zoósporo forma o cisto, seu flagelo é absorvido e uma parede celular é formada (BERGER et al., 2005). Em seguida, o cisto do zoósporo germina e desenvolve um

tubo germinativo que invade a epiderme do hospedeiro (VAN ROOIJ et al., 2012). No interior das células e do estrato granuloso, o fungo inicia a proliferação formando esporângios imaturos, que são transportados para a superfície da pele, promovendo uma diferenciação celular (GREENSPAN et al., 2012; VAN ROOIJ et al., 2012). Os esporângios amadurecem na superfície da pele e são liberados no ambiente (LONGCORE et al., 1999; BERGER et al., 2005) na forma de zoósporos, onde passam a se locomover livremente, completando seu ciclo de vida (ROSENBLUM et al., 2008). Os zoósporos de vida livre, na fase independente do substrato, têm um curto período de atividade e conseguem nadar pequenas distâncias, podendo reinfestar o mesmo substrato ou novos substratos (Figura 1) (ROSENBLUM et al., 2008), promovendo assim sua dispersão.

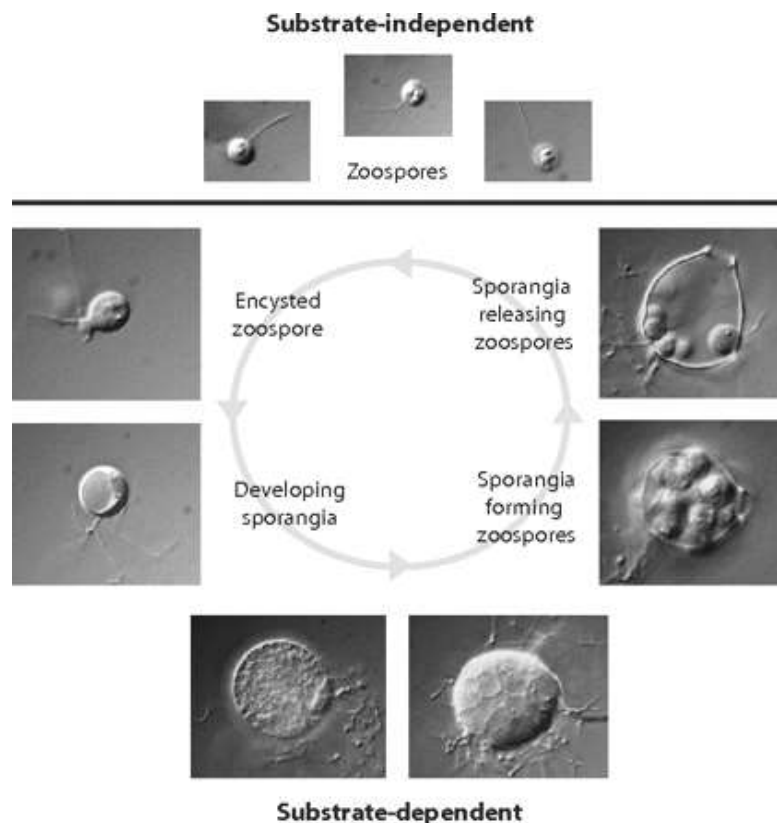


Figura 1. Ciclo de vida de *Batrachochytrium dendrobatidis* na fase independente de substrato, apresentando o estágio de vida em que os zoósporos são flagelados, móveis e de vida livre. Na fase do ciclo de vida dependente de substrato, o zoósporo encistado se desenvolve dentro de zoosporângios, onde produz e libera novos zoósporos. Fonte: ROSENBLUM et al., 2008).

O desenvolvimento do *Bd* é afetado por fatores ambientais, biológicos, químicos e físicos, incluindo salinidade, pH, concentração de oxigênio dissolvido e temperatura (GLEASON et al., 2008). A sua sobrevivência ocorre na faixa de

temperatura entre 4 e 25 °C, apresentando crescimento ótimo entre 17 e 25 °C (PIOTROWSKI et al., 2004), podendo suportar temperaturas até 28 °C (RÖDDER et al., 2013) e o pH ideal é entre 6 e 7 (PIOTROWSKI et al., 2004). No entanto, a temperatura é um dos principais fatores associados à dinâmica da doença (VOYLES et al., 2012), sendo que temperaturas baixas podem intensificar a ação do patógeno (RETALLICK; MIERA, 2007) e temperaturas elevadas podem inibir a sua ação (RICHARDS-ZAWACKI, 2010). Assim, a prevalência de infecção, intensidade e mortalidade do hospedeiro é dependente da atividade do patógeno, que altera sua dinâmica de acordo com as condições ambientais, sendo que muitas vezes a temperatura pode favorecer ao fungo e outras vezes ao hospedeiro (BUTLER et al., 2013). Ainda, outros fatores como a altitude (GRÜNDLER et al., 2012) e latitude (KRIGER et al., 2007) também estão correlacionados com a prevalência de *Bd*. No entanto, a altitude não tem sido considerada um elemento chave, pois diversos estudos mostram que o fungo também apresenta elevada prevalência em regiões mais baixas (KNAPP et al., 2011; PREUSS et al., 2016; LAMBERTINI et al., 2016).

Os sintomas no hospedeiro diferem dependendo do seu estágio de vida. Na fase larval dos anfíbios, são identificadas deformações na boca queratinizada (FISCHER et al., 2009), com despigmentação (BERGER et al., 1998) e também lesões na região da cauda (BRODMAN; BRIGGLER, 2008). Além disso, podem ser observados efeitos subletais como letargia e perda de habilidade para natação, o que dificulta a alimentação e ocasiona alterações no desenvolvimento (HANLON et al., 2015). Em anfíbios adultos, ocorre hiperplasia epidérmica e hiperqueratose, sendo raramente observadas lesões a olho nu (SMITH et al., 2007; FISCHER et al., 2008). O *Bd* altera a função osmorregulatória, levando ao desequilíbrio eletrolítico e a morte, sendo fatal para muitas espécies (VOYLES et al., 2009). A sua virulência está relacionada com a capacidade de causar danos ao hospedeiro (FARRER et al., 2011), desta forma, enquanto algumas espécies de anfíbios se mostram sensíveis, outras conseguem aparentemente coexistir com o *Bd*, sendo consideradas menos susceptíveis à doença (WALKER et al., 2010). O genótipo do *Bd* também é um importante determinante epidemiológico (FARRER et al., 2011).

Diversas linhagens do fungo são encontradas em todos os continentes, e seu transporte é facilitado por atividades comerciais (FISCHER et al., 2007), que resultam no contato e transmissão cruzada de *Bd* e através de recombinação

genética, origina um patógeno virulento que afeta diversas populações de anfíbios (FARRER et al., 2011). A linhagem mais conhecida pela sua virulência é o *Bd*/GPL, que pode ter surgido pela mistura antropogênica de linhagens alopátricas, formando uma recombinação hipervirulenta, dando origem a epidemias (FARRER et al., 2011). No Brasil, são encontradas as linhagens *Bd*/Brasil e a linhagem *Bd*/GPL (JENKINSON et al., 2016). No entanto, a linhagem *Bd*/GPL chegou mais recentemente no bioma da Mata Atlântica do que o *Bd*/Brasil (JENKINSON et al., 2016). Tudo indica que o *Bd*/Brasil, está restrito a uma região de endemismo que fica entre São Paulo e Paraná, e o *Bd*/GPL está amplamente distribuído, principalmente em áreas antropicamente alteradas (JENKINSON et al., 2016). A chegada do *Bd*/GPL ou um aumento da virulência do *Bd*/Brasil, pode ser a explicação para dois picos de declínios de anfíbios observados na Mata Atlântica (CARVALHO et al., 2017). Os picos coincidem com o aumento da atividade de ranicultura na região sudeste da Mata Atlântica, após a década de 1970 (SCHLOEGEL et al., 2009; CARVALHO et al., 2017) e na região sul, no início da década de 1990 (BOTH et al., 2011; CARVALHO et al., 2017).

O comércio de anfíbios é a principal fonte de dispersão do *Bd* entre ranários (SCHLOEGEL et al., 2012; JENKINSON et al., 2016). Alguns estudos têm sugerido que a quitridiomiose apresenta efeitos insignificantes sobre as populações de rã-touro, mesmo quando constatada alta prevalência de *Bd* (HANSELMANN et al., 2004). Assim, pela sua resistência à infecção, a rã-touro é considerada um importante reservatório e vetor de *Bd*, atuando como agente de dispersão (GARNER et al., 2006; SCHLOEGEL et al., 2009, 2010, 2012). No entanto, no Brasil, rã-touro de cativeiro e de vida livre apresentaram baixa intensidade do fungo (TOLEDO et al., 2006). O registro de *Bd* e ausência de morbidade nas rãs de cativeiro reforçam a hipótese de que a alta prevalência e baixa intensidade de infecção representa uma condição de portadores eficientes (SCHLOEGEL et al., 2010). Por outro lado, a prevalência de *Bd* em rã-touro tem sido registrada sempre elevada (GARNER et al., 2006), sendo geralmente maior do que em outras espécies (BEYER et al., 2015). Esta mesma condição tem sido mostrada em diferentes regiões do mundo, parecendo ser um padrão a elevada prevalência e baixa intensidade (DASZAK et al., 2004; ESKEW et al., 2013; BEYER, et al., 2015). A alta prevalência combinada com a baixa carga de zoósporos é suficiente para manter a espécie livre de infecções

letais (PASMANS et al., 2010; MARTEL et al., 2013). Desta forma, a ranicultura no Brasil, além de promover a introdução da rã-touro (JAMES et al., 2015), também pode contribuir para agravar ainda mais o problema do transporte do *Bd* para outras localidades (JENKINSON et al., 2016).

Neste estudo, nós analisamos a variação na prevalência e carga de infecção por *Bd* entre ranários e ambientes naturais em população de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), no sul do Brasil. Para isso, nós avaliamos a prevalência e a carga de zoósporos de *Bd* em rã-touro de ranários e de ambientes naturais e testamos o efeito da distância das lagoas em relação aos ranários na prevalência e carga de zoósporos. Ainda, testamos a influência de variáveis ambientais e das características físicas dos indivíduos na prevalência e carga de zoósporos dos indivíduos infectados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. M. Ranicultura se consolida em cadeia produtiva operando em rede interativa. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, ano 8, n. 11, p. 33-35, jul./dez. 2012.
- ALVES, F. C.; BRANCO, A.; LUCAS, E. M.; FORTES, V. B. Ocorrência da espécie exótica *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) em ambientes naturais nos municípios de Chapecó e Guatambu, Santa Catarina, Brasil. **ACTA Ambiental Catarinense**, v. 5, n. 1/2, p. 35–42, jan./dez. 2008.
- BARR, D. J. S. Phylum Chytridiomycota. In: MARGULIS, L.; CORLISS, J. O.; MELKONIAN M.; CHAPMAN, D. J. (eds.) Handbook of Protoctista. **Jones and Bartlett Publishers**, Boston, p. 454-466, 1990.
- BASTIANI, V. I. M.; LUCAS, E. M. Anuran diversity (Amphibia, Anura) in a Seasonal Forest fragment in southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 1, p. 255-264, fev. 2013.
- BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, p. 271–285, 2005.
- BELLARD, C.; BERTELSMEIER, C.; LEADLEY, P.; THUILLER, W.; COURCHAMP, F. Impacts of climate change on the future of biodiversity. **Ecology Letters**, v. 15, p. 365–377, 2012.
- BELLARD, C.; LECLERC, C.; LEROY, B.; BAKKENES, M.; VELOZ, S.; THUILLER, W.; COURCHAMP, F. Vulnerability of biodiversity hotspots to global change. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, p. 1376–1386, 2014.

BERGER, L.; HYATT, A. D.; SPEARE, R.; LONGCORE, J. E. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 68, p. 51–63, 2005.

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. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 9031-9036, jul. 1998.

BEYER, S. E.; PHILLIPS, C. A.; SHOOLEY, R. L. Canopy cover and drought influence the landscape epidemiology of an amphibian chytrid fungus. **Ecosphere**, v. 6, n. 5, p. 1-18, mai. 2015.

BLACKBURN, T. M.; PYSEK, P.; BACHER, S.; CARLTON, J. T.; DUNCAN, R. P.; JAROSÍK, V.; WILSON, J. R. U.; RICHARDSON, D. M. A proposed unified framework for biological invasions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 7, p. 333–339, 2011.

BORGES-MARTINS, M.; DI-BERNARDO, M. *Rana catesbeiana* (American Bullfrog). Geographic distribution. **Herpetological Review**, v. 33, n. 4, p. 319, 2002.

BOTH, C.; LINGNAU, R.; SANTOS-JR, A.; MADALOZZO, B.; LIMA, L. P.; GRANT, T. Widespread occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. **South American of Herpetology Journal**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 2011.

BOTH C.; MADALOZZO, B.; LINGNAU, R.; GRANT, T. Amphibian richness patterns in Atlantic Forest areas invaded by American bullfrogs. **Austral Ecology**, v. 39, n. 7, p. 864-874, 2014.

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

BUTLER, M. W.; STAHLSCHMIDT, Z. R.; ARDIA, D. R.; DAVIES, S.; DAVIS, J. GUILLETTE, L. J.; JOHNSON, N.; McCORMICK, S. D.; McGRAW, K. J.; DE NARDO, D. F. Thermal sensitivity of immune function: evidence against a generalist-specialist trade-off among endothermic and ectothermic vertebrates. **The American Naturalist**, v. 181, p. 761–774, 2013.

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

CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 284, p. 20162254, 2017.

CRAWFORD, A. J.; LIPS, K. R.; BERMINGHAM, E. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 13777–13782, 2010.

CRIBB, A. Y.; AFONSO, A. M.; MOSTÉRIO, C. M. F. **Manual técnico de ranicultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 73 p.

CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. **Saúde e Biologia**, v. 4, n. 2, p. 34-46, jul./dez. 2009.

D'AMORE, A.; HEMINGWAY, V.; WASSON, K. Do a threatened native amphibian and its invasive congener differ in response to human alteration of the landscape? **Biological Invasions**, v. 12, p.145–54, 2010.

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

DASZAK, P.; STRIEBY, A.; CUNNINGHAM, A. A.; LONGCORE, J. E.; BROWN, C. C.; PORTER, D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. **Herpetological Journal**, v. 14, p. 201–207, 2004.

DI ROSA, I.; SIMONCELLI, F.; FAGOTTI, A.; PASCOLINI, R. Ecology: the proximate cause of frog declines? **Nature**, v. 447, n. 7144, p. E4-E5, mai. 2007.

FARRER, R. A.; WEINERT, L. A.; BIELBY, J.; GARNER, T. W.; BALLOUX, F.; CLARE, F.; BOSCH, J.; CUNNINGHAM, A. A.; WELDON, C.; DU PREEZ, L. H.; ANDERSON, L.; POND, S. L.; SHAHAR-GOLAN, R.; HENK, D. A.; FISHER, M. C. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 46, p. 18732–18736, 2011.

FATMA (Fundação do Meio Ambiente). Parque Estadual das Araucárias – Plano de manejo. v. 01, 2007. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/upload/ucs/araucarias/5.2_Diagn%C3%B3sticoPEA_Parte%204.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2017.

FEIX, R. D; ABDALLAH, P. R.; FIGUEIREDO, M. R. C. **Análise econômica da criação de rãs em regiões de clima temperado**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, v. 52, 2004, Cuiabá, MT. Anais. Cuiabá, MT: SOBER, 2004.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. The relationship between the introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. **Fungal Biological Review**, v. 21, p. 2–9, 2007.

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

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

FORTI, L. R.; BECKER, C. G.; TACIOLI, L.; PEREIRA, V. R.; SANTOS, A. C. F. A.; OLIVEIRA, I.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. Perspectives on invasive amphibians in Brazil. **PloS One**, v. 12, n. 9, p. e0184703, 2017.

GARCÍA-BERTHOU, E. The characteristics of invasive fishes: what has been learned so far? **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33–55, 2007.

GARNER, T. W. J.; PERKINS, M. W.; GOVINDARAJULU, P.; SEGLIE, D.; WALKER, S.; CUNNINGHAM, A.; FISHER, M. C. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biology Letters**, n. 2, p. 455-459, mai. 2006.

GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. **Biological Invasions**, v. 10, p. 585-590, 2008.

GISD (Global Invasive Species Database), 2018. Disponível em: <<http://193.206.192.138/gisd/search.php>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

GLEASON, F. H.; KAGAMI, M.; LEFEVRE, E.; SIME-NGANDO, T. The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 17-25, 2008.

GREENSPAN, S. E.; LONGCORE, J. E.; CALHOUN, A. J. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. **Diseases Aquatic Organisms**, v. 100, p. 201–210, 2012.

GRÜNDLER, M. C.; TOLEDO, L. F.; PARRA-OLEA, G.; HADDAD, C. F. B.; GIASSON, L. O. M.; SAWAYA, R. J.; PRADO, C. P. A.; ARAUJO, O. G. S.; ZARA, F. J.; CENTENO, F. C.; ZAMUDIO, K. R. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. **Diseases Aquatic Organisms**, v. 97, p. 173–184, 2012.

HANLON, S. M.; LYNCH, K. J.; KERBY, J.; PARRIS, M. J. *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. **Diseases Aquatics Organisms**, v. 112, p. 237–242, 2015.

HANSELMANN, R.; RODRIGUEZ, A.; LAMPO, M.; FAJARDO-RAMOS, L.; AGUIRRE, A. A.; KILPATRICK, A. M.; RODRIGUES, J. P.; DASZAK, P. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. **Biological Conservation**, v. 120, p. 115-119, fev. 2004.

HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010.

INSTITUTO HÓRUS. Base de dados de espécies exóticas invasoras no Brasil. Disponível em: <www.institutohorus.org.br>. Acesso em: 20 dez. 2017.

JAMES, T. Y.; TOLEDO, L. F.; ROODER, D.; SILVA LEITE, D.; BELASEN, A. M.; BETANCOURTE-ROMAN, C. M.; JENKINSON, T. S.; SOTO-AZAT, C.; LAMBERTINI, C.; LONGO, A. V.; TUGGERI, J.; COLLINS, J. P.; BURROWES, P. A.; LIPS, K.; ZAMUDIO, K. R.; LONGCORE, J. E. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 18, p. 4079–4097, 2015.

JENKINSON, T. S.; BETANCOURT ROMÁN, C. M.; LAMBERTINI, C.; VALENCIA-AGUILAR, A.; RODRIGUEZ, D.; NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; RUGGERI, J.; BELASEN, A. M.; DA SILVA LEITE, D.; ZAMUDIO, K. R.; LONGCORE, J. E.; TOLEDO, L. F.; JAMES, T. Y. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. **Molecular Ecology**, v. 25, p. 2978–2996, 2016.

KAEFER, I. L.; BOELTER, R. A.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of the invasive bullfrog. **Annales Zoologica Fennici**, v. 44, p. 435-444, 2007.

KATS, L. B.; FERRER, R. P. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 99–110, 2003.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R. Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Ecology**, v. 78, p. 1752–1760, 1997.

KILPATRICK, A. M.; BRIGGS, C. J.; DASZAK, P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. **Trends Ecology and Evolution**, v. 25, n. 2, p. 109–11, 2010.

KNAPP, R. A.; BRIGGS, C. J.; SMITH, T. C.; MAURER, J. R. No where to hide: impact of a temperature-sensitive amphibian pathogen along an elevation gradient in the temperate zone. **Ecosphere**, v. 2, n. 8, 2011.

KRIGER, K. M.; PEREGLUO, F.; HERO, J. M. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. **Conservation Biology**, v. 21 n. 5, p. 1280 – 290, mai. 2007.

KUMSCHICK, S.; RICHARDSON, D. M. Species-based risk assessments for biological invasions: advances and challenges. **Diversity and Distributions**, v. 19, p. 1095–1105, 2013.

KUPFERBERG, S. J. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: The role of larval competition. **Ecology**, v. 78, p. 1736–1751, 1997.

LAMBERTINI, C.; BECKER, G.; JENKINSON, T.; RODRIGUEZ, C. D.; LEITE, D.; JAMES, T. Y.; ZAMUDIO, K. R.; TOLEDO, L. F. Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 15-21, 2016.

LAMBERTINI, C.; RODRIGUEZ, D.; BRITO, F. B.; LEITE, D. S.; TOLEDO, L. F. Diagnóstico do fungo Quitridio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Métodos em Herpetologia. **Herpetologia Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 12-17, mar. 2013.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, p. 219–227, 1999.

LAUFER, G.; GOBEL, N. Habitat degradation and biological invasions as a cause of amphibian richness loss: a case report in Aceguá, Cerro Largo, Uruguay. **Phyllomedusa**, v.16, n. 2, p. 289–293, 2017.

LIPS, K. R. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. **Conservation Biology**, v. 13, n. 1, p. 117–125, fev. 1999.

LONGO, A. D. **Manual de Ranicultura**: uma nova opção de pecuária. 1 ed. Rio de Janeiro: Ediouro do campo, 1987.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; DE POORTER, M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. **Invasive Species Specialist Group of the World Conservation Union**, Auckland, New Zealand, p. 1-12, 2000.

LOYOLA, J.; NABOUT, J. C.; TRINDADE-FILHO, J.; LEMES, P.; URBNA-CARDONA, J. N.; DOBROVOLSKI, R.; SAGNORI, M. D.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Climate change might drive species into reserves: a case study of the american bullfrog in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Alytes**, v. 29, p. 61-74, 2012.

LUCAS, E. M.; FORTES, V. B. Frog diversity in the Floresta Nacional de Chapecó, Atlantic Forest of southern Brazil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 51-61, jul./set. 2008.

LUCAS, E. M.; MAROCCO, J. C. Anurofauna (Amphibia, Anura) em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 1, n. 11, p. 1-8, 2011.

LUTZ C. G.; AVERY J. L. Bullfrog culture. **Southern Regional Aquaculture Center SRAC**, n. 436, p. 1-4, mar.1999.

MADALOZZO, B.; BOTH, C.; CECHIN, S. Can protected areas with agricultural edges avoid invasions? The case of Bullfrogs in the Southern Atlantic Rainforest in Brazil. **Zoological studies**, v. 50, n. 51, p. 1-26, 2016.

MARTEL, A.; ADRIAENSEN, C.; SHARIFIAN-FARD, M.; SLOUIJS, A. S. V. D.; LOUETTE, G.; BAERT, K.; CROMBAGHS, B.; DEWULF, J.; PASMANS, F. The absence of zoonotic agents in invasive bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in Belgium and the Netherlands. **EcoHealth**, v. 10, p. 344–347, 2013.

MEDEIROS, C. I.; BOTH, C.; KAEFER, I. L.; CECHIN, S. Z. Reproductive phenology of the American Bullfrog in subtropical Brazil: photoperiod as a main determinant of seasonal activity. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, p. 1909-1921, mar. 2016. Suplemento 3.

MITCHELL, K. M.; CHURCHER, T. S.; GARNER, T. W. J.; FISCHER, M. C. Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. **Proceedings of the Royal Society B.**, v. 275, p. 329-334, nov. 2007.

MONASTERSKY, R. Biodiversity: Life—a status report. **Nature**, v. 516, p. 158–161, 2014.

MORETTO, G. A.; RODRIGUES, C. A. G.; CRIBB, A. Y.; FURTADO, A. L. S. **Áreas potencias para a criação de rã-touro-gigante (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802) na região sul do Brasil.** VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013, Campinas, São Paulo, 13 a 15 de agosto de 2013.

NENTWIG, W. Pathways in animal invasions. In: Nentwig W (ed), Biological invasions, Ecological Studies 193. **Springer**, Berlin, v. 1, p. 11–27, 2007.

NORI, J.; URBINA-CARDONA, J. N.; LOYOLA, R. D.; LESCANO, J. N.; LEYNAUD, G. C. Climate Change and American Bullfrog Invasion: What could we expect in South America? **PloS One**, v. 6, n. 10, p. 1-8, 2011.

OCCHIPINTI-AMBROGI, A.; GALIL, B. S. A uniform terminology on bioinvasions: A chimera or an operative tool? **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 688–694, 2004.

OLSON, D. H.; AANENSEN, D. M.; RONNENBERG, K. L.; POWELL, C. I.; WALKER, S. F.; BIELBY, J.; GARNER, T. W. J.; WEAVER, G.; The *Bd* Mapping Group; FISCHER, M. C. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. 01–13, fev. 2013.

PASMANS, F.; MUIJSERS, M.; MAES, S.; VAN ROOIJ, P.; BRUTYN, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.; MARTEL, A. Chytridiomycosis related mortality in a midwife toad (*Alytes obstetricans*) in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 79, p. 460–462, 2010.

PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycological Society of America Stable**, v. 96, n. 1, p. 9-15, Jan./Fev. 2004.

PREUSS, J. F.; LAMBERTINI, C.; LEITE, D. S.; TOLEDO, L. F.; LUCAS, E. M. Crossing the threshold: an amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. **Studies on Neotropical fauna and environment**, v. 51, n. 1, p. 68-77, mar. 2016.

PYSEK, P.; RICHARDSON, D. M. Invasive species, environmental change and management, and health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, n. 1, p. 25–55, 2010.

PYSEK, P.; RICHARDSON, D. M. Invasive species. **Berkshire Publishing group**, v. 1, p. 211–219, 2012.

PYSEK, P.; RICHARDSON, D. M.; REJMÁNEK, M.; WEBSTER, G. L.; WILLIAMSON, M.; KIRSHNER, J. Alien plants in checklists and floras: Towards better communication between taxonomists and ecologists. **Taxon**, v. 53, p.131–143, 2004.

QUIROGA, L. B.; MORENO, M. D.; CATALDO, A. A.; ARAGÓN-TRAVERSO, J. H.; PANTANO, M. V.; OLIVARES, J. P. S. O.; SANABRIA, E. A. Diet composition of an invasive population of *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog) from Argentina. **Journal of Natural History**, p. 1-15, 2015.

RETALLICK, R. W. R.; MIERA, V. Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of infection. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 75, p. 201–207, 2007.

RICHARDSON, D. M.; PYSEK, P.; REJMÁNEK, M.; BARBOUR, M. G.; PANETTA, F. D.; WEST, C. J. Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. **Diversity & Distributions**, v. 6, p. 93-107, 2000.

RICHARDS-ZAWACKI, C. L. Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 277, p. 519–528, 2010.

ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. **Biologia da Conservação: essências**. São Carlos: RiMa, 2006, 582p.

RODRIGUEZ, D.; BECKER, C. G.; PUPIN, N. C.; HADDAD, C. F. B.; ZAMUDIO, K. R. Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. **Molecular Ecology**, v. 23, p.774–787, 2014.

RÖDDER, D.; SCHULTE, U.; TOLEDO, L. F. High environmental niche overlap between the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and invasive bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) enhance the potential of disease transmission in the Americas. **North-Western journal of zoology**, v. 9, n. 1, p. 178-184, 2013.

ROSA, C. A.; CURI, N. H. A.; PUERTAS, F.; PASSAMANI, M. Alien terrestrial mammals in Brazil: current status and management. **Biology Invasions**. v. 19, p. 2101–2123, 2017.

ROSENBLUM, E. B.; STAJICH, J.; MADDOXA, N.; EISEN, M. Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 17034-17039, 2008.

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

SCHLOEGEL, L. M.; FERREIRA, C. M.; JAMES, T. Y.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J. E.; HYATT, A. D.; YABSLEY, M.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; MASSONI, R.; DAVIES, A. J.; DASZAK, P. North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. **Animal Conservation**, v. 13, n. 1, p. 53-61, 2010.

SCHLOEGEL, L. M.; HERO, J. M.; BERGER, L.; SPEARE, R.; McDONALD, K.; DASZAK, P. The decline of the sharp-snouted day frog (*Taudactylus acutirostris*): The first documented case of extinction by infection in a free-ranging wildlife Species? **EcoHealth**, v. 3, p. 35-40, mar. 2006.

SCHLOEGEL, L. M.; PICCO, A. M.; KILPATRICK, A. M.; DAVIES, A. J.; HYATT, A. D.; DASZAK, P. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1420-1426, jul. 2009.

SCHLOEGEL, L. M.; TOLEDO, L. F.; LONGCORE, J. E.; GREENSPAN, S. E.; VIEIRA, C. A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C. M.; HIPOLITO, M.; DAVIES, A. J.; CUOMO, C. A.; DASZAK, P.; JAMES, T. Y. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 5162- 5177, jun. 2012.

SEPULVEDA, A.; LAYHEE, M.; STAGLIANO, D.; CHAFFIN, J.; BEGLEY, A.; MAXELL, B. Invasion of American bullfrogs along the Yellowstone River. **Aquatic Invasions**, v. 10, n. 1, p. 69–77, 2015.

SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; SPEARE, R.; CASHINS, S.; McDONALD, R.; PHILLOTT, D.; HINES, H. B.; KENYON, N. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **EcoHealth**, v. 4, p. 125-134, 2007.

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

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

- TALLEY, B. L.; MULETZ, C. R.; VREDENBURG, V. T.; FLEISCHER, R. C.; LIPS, K. R. A century of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Illinois amphibians (1888-1989). **Biological Conservation**, v. 182, p. 254–261, 2015.
- TINGLEY, R.; ROMAGOSA, C. M.; KRAUS, F.; BICKFORD, D.; PHILLIPS, B. L.; SHINE, R. The frog filter: amphibian introduction bias driven by taxonomy: body size and biogeography. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, p. 496–503, 2010.
- TOLEDO, L. F.; BRITTO, F. B.; ARAÚJO, O. G. S.; GIASSON, L. M. O.; HADDAD, C. F. B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, n. 3, p. 185-191, dez. 2006.
- VAN ROOIJ, P.; MARTEL, A.; D'HERDE, K.; BRUTYN, M.; CROUBELS, S.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin is host dependent. **PLoS One**, v. 7, p. e41481, 2012.
- VIZOTTO, L. D. Ranicultura. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 42-45, 1984.
- VOYLES, J.; JOHNSON, L. R.; BRIGGS, C. J.; CASHINS, S. D.; ALFORD, R. A.; BERGER, L.; ROSENBLUM, E. B. Temperature alters reproductive life history patterns in *Batrachochytrium dendrobatidis*, a lethal pathogen associated with the global loss of amphibians. **Ecology and Evolution**, v. 2, p. 2241–2249, 2012.
- VOYLES, J.; YOUNG, S.; BERGER, L.; CAMPBELL, C.; VOYLES, W. F.; DINUDOM, A.; COOK, D.; WEBB, R.; ALFORD, R. A.; SKERRATT, L. F.; SPEARE, R. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, p. 582–585, 2009.
- WAKE, D. B. Declining amphibian populations: A global phenomenon. **Science**, v. 253, p. 860, 1991.
- WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, Suplemento 1, p. 11466–11473, ago. 2008.
- WALKER, S. F.; BOSCH, J. G. V.; GARNER, T. W.; CUNNINGHAM, A. A.; SCHMOLLER, D. S.; NINYEROLA, M.; HENK, D. A.; GINESTET, C.; ARTHUR, C. P.; FISCHER, M. C. Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. **Ecology letters**, v. 13, p. 372–382, 2010.

CAPÍTULO I



**ALTA PREVELÊNCIA E BAIXA INTENSIDADE DE INFECÇÃO PELO
FUNGO QUITRIDIO EM POPULAÇÕES DE RÃ-TOURO NA MATA
ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL**

ALTA PREVELÊNCIA E BAIXA INTENSIDADE DE INFECÇÃO PELO FUNGO QUITRIDIO EM POPULAÇÕES DE RÃ-TOURO NA MATA ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL

Roseli Coelho dos Santos, Veluma Ialú Molinari De Bastiani, Luisa de Pontes Ribeiro, Mariana Retuci Pontes, Domingos da Silva Leite, Luís Felipe Toledo, Gilza Maria de Souza Franco e Elaine Maria Lucas Gonsales

RESUMO

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) tem sido considerada um importante reservatório e vetor do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), causador de quitridiomiose. Neste estudo, nós testamos o efeito dos ranários que cultivam rã-touro na dispersão de *Bd* para ambientes naturais. Realizamos as coletas em seis ranários e oito localidades em ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. Coletamos amostras de secreção cutânea e verificamos a taxa de infecção com qPCR. Encontramos alta prevalência e baixa carga de zoósporos de *Bd* em rã-touro. Todos os locais amostrados apresentaram indivíduos infectados, mas a prevalência e a carga de zoósporos não diferiram entre ranários e ambientes naturais. Encontramos maior prevalência de *Bd* em ranários com manejo aberto. A carga de zoósporos diferiu entre os sexos. A temperatura da água influenciou na carga de zoósporos dos indivíduos de ranários e ambiente natural. Nos ranários, a carga de zoósporos também foi influenciada pelo pH e temperatura do ar. A alta prevalência de *Bd* encontrada neste estudo sugere que os ranários com manejo que alternam o ciclo de vida entre cativeiro e lagoas podem estar exercendo um papel de fonte constante de entrada de patógenos para o ambiente natural, além da disseminação de cepas para outros ranários, através da comercialização. Medidas mais efetivas de controle, manejo e monitoramento de ranários são necessárias e urgentes na região sul do Brasil.

Palavras-chaves: Conservação biológica, doenças emergentes, espécie exótica, invasão biológica, Mata Atlântica.

HIGH PREVALENCE AND LOW INTENSITY OF INFECTION BY THE CHYTRID FUNGUS IN RAINFOREST BULLFROG POPULATIONS IN SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

The bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is considered an important reservoir and vector of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which can cause chytridiomycosis in probably most amphibian species. In this study, we evaluated frog farms as a possible center of *Bd* dispersion. We compared the infection load of captive and wild populations of bullfrogs in six frog farms and eight natural ponds in southern Brazil. In general, we found a high prevalence and low infection loads in bullfrogs. We observed individuals infected with *Bd* in all farms and natural ponds sampled. The prevalence and infection load did not differ between frog farms and natural ponds. We found a higher *Bd* prevalence in frog farms with open life cycle breeding management. Females showed higher zoospore loads than males. Water temperature influenced negatively the zoospore load of individuals in the frog farms and natural environments. In frog farms, zoospore load was positively influenced by pH and air temperature. We suggest that frog farms that alternate life cycle management between captivity and ponds may be providing constant dispersion of pathogen spores into the natural environment. Therefore, we advocate for the complete enclosure of bullfrogs within farms, and recommend the monitoring of wild frogs in frog farm surroundings on a worldwide scale.

Keywords: Biological conservation, *Batrachochytrium dendrobatidis*, invasive species, *Lithobates catesbeianus*, wildlife diseases.

1 INTRODUÇÃO

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é considerada uma das 100 piores espécies invasoras do mundo e a principal dentre os anfíbios (LOWE et al., 2000; GISD, 2018). No Brasil, populações estabelecidas de rã-touro se encontram principalmente nas regiões sul e sudeste (LOYOLA et al., 2012), em áreas de Pampa e Mata Atlântica (GIOVANELLI et al., 2008; BOTH et al., 2011). A Mata Atlântica é considerada um *hotspots* de biodiversidade (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2005) com elevada riqueza e endemismo de anfíbios (HADDAD et al., 2013). No entanto, estudos indicam que as mudanças climáticas dos próximos anos podem propiciar condições ainda mais favoráveis para a

ampliação da distribuição geográfica de espécies exóticas, como a rã-touro (FICETOLA et al., 2007; GIOVANELLI et al., 2008), ou ainda, a introdução de novas espécies (FORTI et al., 2017). Desta forma, a rã-touro representa uma importante ameaça às espécies de anfíbios brasileiras, assim como a fragmentação de habitat (MYERS et al., 2000; BECKER et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009) e mudanças climáticas (BELLARD et al., 2012, 2014; OLIVEIRA et al., 2016a; 2016b) e doenças pandêmicas (CARVALHO et al., 2017).

Os efeitos negativos ocasionados pela invasão da rã-touro nos ambientes naturais podem ser diretos ou indiretos, e dentre os mais estudados estão a predação e a competição com espécies nativas (KIESECKER et al., 1997; KUPFERBERG, 1997; BOONE et al., 2004; HANSELMANN et al., 2004; PEARL et al., 2004; KRAUS, 2015). Tais efeitos, resultam em alterações na estrutura das comunidades e podem ser agravados pela alta capacidade de dispersão e elevada densidade populacional (QUIROGA et al., 2015). A dispersão e a densidade populacional são facilitadas pela maturação sexual precoce, alta fecundidade e, no sul do Brasil, período de reprodução ampliado para todo o ano (KAEFER et al., 2007; MEDEIROS et al., 2016). No entanto, além da competição e predação, mais recentemente, a rã-touro tem sido considerada uma importante propagadora de agentes infecciosos, como o ranavírus e o fungo quitrídio (SCHLOEGEL et al., 2006; SKERRATT et al., 2007; CRAWFORD et al., 2010; OLSON et al., 2013; O'HANLON et al., 2018). Assim, por ser invasora e portadora de patógenos, a rã-touro representa uma dupla ameaça às populações de anfíbios nativos (KATS e FERRER, 2003; HANSELMANN et al., 2004). Tanto a incidência de infecção pelo fungo quitrídio, como a presença de rã-touro, já foram associadas a declínios e extinções locais de anfíbios em diversas regiões do mundo (MIAUD et al., 2016; O'HANLON et al., 2018).

As extinções de anfíbios ocasionadas por quitridiomiose, infecções causadas por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), podem ocorrer de forma muito rápida (BERGER et al., 1998; LIPS 1999; DASZAK et al., 2003; STUART et al., 2004). No entanto, os efeitos da doença variam entre espécies (SEARLE et al., 2011; MESQUITA et al., 2017) e em relação às características dos ambientes. Alguns estudos têm sugerido que a quitridiomiose apresenta efeitos insignificantes sobre as populações de rã-touro (HANSELMANN et al., 2004) e devido a uma provável

tolerância à infecção, ela pode ser considerada como reservatório e um importante vetor de *Bd* (GARNER et al., 2006; SCHLOEGEL et al., 2009, 2010, 2012; GERVASI et al., 2013; MARTEL et al., 2013; BEYER et al., 2015; ESKEW et al., 2015; ADAMS et al., 2017). Estudos realizados em ranários indicaram uma alta prevalência de *Bd* e ausência de sinais de morbidade, reforçando a hipótese de portadores eficientes (SCHLOEGEL et al., 2010; GREENSPAN et al., 2012), capazes de manter baixos níveis de infecção (DASZAK et al., 2004). Todavia, ainda faltam estudos que auxiliem na compreensão sobre o papel da rã-touro como efetiva dispersora do fungo e também dos criadouros, como potenciais focos de dispersão para ambientes naturais.

A previsão de uma possível ampliação da área de distribuição da rã-touro na América do Sul, incluindo a região sul do Brasil (GIOVANELLI et al., 2008; BOTH et al., 2011; LOYOLA et al., 2012) torna o cenário de conservação bastante preocupante nessa região, pois coloca as espécies nativas em um grau maior de vulnerabilidade. Um agravante é que o fungo *Bd* apresenta crescimento ideal em condições de temperatura e pH equivalentes ao ideal para os anfíbios (PIOTROWSKI et al., 2004; RÖDDER et al., 2013; VOYLES et al., 2017). Considerando que a maior estabilidade das condições físicas e químicas e a alta densidade populacional de rã-touro em cativeiro podem potencializar a proliferação do *Bd*. Considerando que escapes e solturas são relativamente comuns em ranários, originando novas populações na paisagem (COLLINS et al., 2009; BOTH et al., 2011; ADAMS et al., 2017; MARHANKA et al., 2017), esta espécie pode ser uma importante disseminadora do fungo para os ambientes naturais, e os ranários podem apresentar um papel chave neste processo.

Neste estudo, nós analisamos o papel dos ranários como potencializadores da dispersão de *Bd* para o ambiente natural. Para isso, quantificamos a prevalência e a carga de zoósporos de *Bd* em rã-touro de ranários e ambientes naturais. Se os ranários atuam como potenciais dispersores, tanto ranários como ambientes aquáticos próximos deveriam manter indivíduos infectados, tanto pela possibilidade de escape de indivíduos como pelo lançamento da água possivelmente contaminada com zoósporos dos ranários para os ambientes naturais do entorno. Ainda, quanto mais próximo de ranário, provavelmente maior é a prevalência e carga de infecção em rã-touro no ambiente natural. Finalmente, ainda avaliamos alguns fatores que

podem estar afetando nos valores de infecção, relacionados aos indivíduos (sexo, faixa etária e tamanho) e ao ambiente (pH, umidade relativa do ar, temperatura do ar e da água).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

Realizamos as amostragens nas regiões oeste e sudoeste do Paraná nos municípios de Medianeira, Santa Izabel do Oeste e Sulina, e oeste de Santa Catarina nos municípios de Chapecó, Guatambu, São Domingos e São Lourenço do Oeste, sul do Brasil (Figura 1). A região de estudo está inserida no domínio do bioma Mata Atlântica, em fitofisionomias de Floresta Ombrófila Mista (VELOSO et al., 1991; VIBRANS et al., 2008) e Floresta Estacional Decidual (VIBRANS et al., 2008). O clima da região de estudo abrange dois tipos, *Cfa* (mesotérmico subtropical úmido, com verões quentes) e *Cfb* (mesotérmico subtropical úmido, com aumento da temperatura no verão), conforme a classificação de Köppen (ALVARES et al., 2013). No Paraná, o clima do tipo *Cfa* está presente em toda a região oeste, no litoral e na região ocidental, no vale do rio Iguaçu, sempre abaixo de altitudes entre 750 e 800 m (ALVARES et al., 2013). Em Santa Catarina, o clima *Cfa* abrange a região oeste, em altitudes inferiores a 700 m e o *Cfb* abrange a região noroeste, seguindo a linha de elevação do relevo, na divisa entre os estados do Paraná e Santa Catarina, em altitudes entre 800 e 1000 m (ALVARES et al., 2013).

Realizamos as amostragens em seis ranários e oito pontos com lagoas naturais, totalizando 14 locais de amostragem. Dos oito pontos com lagoas em ambiente natural, quatro eram próximos de ranários (1, 4, 5 e 6), se encontravam a distâncias de 0,1 a 10 km do ranário mais próximo, e quatro eram distantes e sem influência de ranários (7 e 8), e se encontravam a distâncias de 40 a 80 km de ranários em funcionamento (Tabela 1; Figura 1).

Todos os ranários apresentaram sistema de criação intensiva, com instalações em alvenaria, piso em concreto e distribuição linear de cocho, abrigo e piscina. As paredes eram cercadas por tela e um deles por lona, as quais funcionavam como barreira para evitar escapes (Figura S1A-B). Mesmo assim, durante as amostragens presenciamos escapes pelo canal de saída da água, de

indivíduos juvenis. A água que abastece os estabelecimentos são provenientes de nascentes próximas e os efluentes líquidos são enviados sem tratamento para o ambiente.

Um, dos seis ranários amostrados, realiza o manejo “fechado”, com todo o ciclo de vida das rãs confinado dentro do ranário. Neste tipo de manejo os girinos ou juvenis geralmente são importados de outros ranários. Os demais ranários, realizam o manejo “aberto”, no qual o amplexo e o desenvolvimento de girinos acontece em lagoas adjacentes, fora do confinamento, na mesma propriedade do ranário. Os ranários apresentam capacidade para abrigar entre 500 e 5.000 rãs, com exceção de um, com capacidade para aproximadamente 50.000 indivíduos. O número de indivíduos variou de 200 a 440 nas baías de amostragem. A distância entre ranários foi de 9 a 160 km.

Nos ambientes naturais, consideramos um ponto de amostragem o conjunto de lagoas amostradas, uma vez que eram localizadas sempre adjacentes umas das outras. Todas as lagoas amostradas eram situadas em áreas abertas ou em borda de mata, geralmente com vegetação predominante composta de gramíneas nas margens (Figura S1). Frequentemente, as lagoas se situavam em áreas destinadas à criação bovina e serviam tanto para dessedentação do gado como para a criação de peixes.

Tabela 1. Localidades de amostragem de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. Os locais estão identificados por RA = Ranário; LA = Lagoa natural; Profundidade = altura média da coluna d'água das baías e das lagoas; Vegetação = vegetação predominante nas margens das lagoas.

Local	Município/Estado	Coordenadas	Elevação (m)	Área (m ²)	Profundidade (m)	Densidade (Ind./m ²)	Distância mínima entre ranários (km)	Distância mínima entre lagoa amostrada e ranário (km)	Vegetação
Ranários									
RA01	Medianeira/PR	25°14'35,87" 54°07'5,27"	383	12,5	0,11 ± 0,01 (0,10 - 0,12)	24	160,0	--	--
RA02	Santa Izabel do Oeste/PR	25°43'40,58" 53°24'16,20"	414	10,5	0,12 ± 0,02 (0,10 - 0,15)	38,1	83,0	--	--
RA03	Sulina/PR	25°42'19,23" 52°42'18,56"	482	28	0,12 ± 0,02 (0,10 - 0,15)	17,8	83,0	--	--
RA04	Chapecó/SC	27°02'55,89" 52°38'21,67"	649	12,2	0,12 ± 0,02 (0,10 - 0,15)	28,7	9,1	--	--
RA05	Chapecó/SC	27°08'27,24" 52°38'33,20"	649	14	0,12 ± 0,02 (0,10 - 0,15)	21,4	10,1	--	--
RA06	Guatambu/SC	27°01'42,50" 52°43'42,90"	589	150	0,15 ± 0,03 (0,10 - 0,20)	1,3	9,1	--	--

Local	Município/Estado	Coordenadas	Elevação (m)	Área (m ²)	Profundidade (m)	Densidade (Ind./m ²)	Distância mínima entre ranários (km)	Distância mínima entre lagoa amostrada e ranário (km)	Vegetação
Lagoas									
LA01	Medianeira/PR	25°14'35,87" 54°07'15,27"	380	824	1,16 ± 0,11 (1,00-1,30)	0,02	--	0,1	Arbórea
LA02	Chapecó/SC	27°03'05,45" 52°37'25,84"	659	4.661	1,37 ± 0,27 (1,00-1,80)	0,003	--	1,5	Gramíneas
LA03	Chapecó/SC	27°08'01,58" 52°38'50,31"	645	2.758	1,64 ± 0,48 (1,00-2,50)	0.006	--	0,9	Gramíneas
LA04	Guatambu/SC	27°03'12,60" 52°44'22,75"	579	2.046	1,25 ± 0,15 (1,00-1,50)	0,006	--	2,5	Gramíneas
LA05	São Domingos/SC	26°39'07.64" 52°32'30.33"	564	131	1,22 ± 0,12 (1,00-1,40)	0,10	--	46,0	Arbustiva
LA06	São Domingos/SC	26°38'57.34" 52°32'23.26"	579	5.600	0,90 ± 0,20 (0,50-1,20)	0,002	--	47,0	Gramíneas
LA07	São Lourenço do Oeste/SC	26°21'14.28" 52°48'15.76"	815	1.067	0,88 ± 0,35 (0,30-1,50)	0,008	--	72,0	Gramíneas
LA08	São Lourenço do Oeste/SC	26°20'58.78" 52°49'48.53"		1.329	0,87 ± 0,27 (0,50-1,30)	0.024	--	71,0	Gramíneas

2.2 Coleta de dados

Coletamos amostras de material micótico em *L. catesbeianus* de setembro de 2016 a maio de 2017. Nos ranários, coletamos um total de 121 amostras de material micótico, de 20 ou 21 indivíduos/ranário. Os exemplares amostrados em cada ranário ocupavam uma única baia. Capturamos os exemplares manualmente com uso de luvas descartáveis estéreis, trocadas a cada novo espécime. Para a coleta de amostras de secreção cutânea, utilizamos um *swab* estéril para cada exemplar, o qual era friccionado na região inguinal, membranas interdigitais, membros superiores e membros inferiores (BOYLE et al., 2004; LAMBERTINI et al., 2013). Os *swabs* foram acondicionados em *ependorfs* individuais e estocados em freezer à -22 °C. Posteriormente à coleta das amostras, cada espécime era solto em outra baia, para evitar a captura do mesmo indivíduo. Em cada ranário registramos o pH, umidade relativa do ar (URA), temperatura do ar e temperatura da água, área da baia, profundidade da água, número indivíduos da baia de coleta e o tipo de manejo. Registramos o tipo do manejo, considerando aberto ou fechado, conforme descrito acima.

Nas lagoas, coletamos material micótico de 11 a 22 indivíduos por ponto amostral, totalizando 155 amostras. Localizamos os indivíduos por busca ativa, visual e auditiva, das 20:00 às 00:00 h. Os indivíduos foram acondicionados individualmente para a coleta de material micótico, com auxílio de luvas descartáveis e *swab*, seguindo o mesmo procedimento realizado com os exemplares dos ranários. Registramos a abundância de indivíduos, o pH da água, a umidade relativa do ar (URA), a temperatura do ar e da água e a profundidade de cada lagoa. A abundância de cada lagoa foi estimada pelo número máximo de machos em atividade de vocalização a cada noite de amostragem. Todos os espécimes capturados e mortos foram transportados ao laboratório, identificado o sexo e mensurado o comprimento rostro-cloacal (CRC, em mm), massa (g) e IMC (Índice de Massa Corporal). Para calcular o IMC, nós usamos a seguinte equação: $\dot{M}_i = M_i [L_0/L_i]^{bSMA}$ (PEIG; GREENN, 2009), onde, M_i e L_i são massa e comprimento-rostro-cloacal (CRC) mensurados de cada indivíduo (i), respectivamente; o $bSMA$ foi obtido através da relação entre M e L , com uso da correlação de Pearson para estimar o valor de r ; L_0 é o valor da média aritmética de CRC de todos os indivíduos amostrados em lagoas naturais; e \dot{M}_i é a massa corporal individual (i), quando a

medida linear o corpo é padronizada por L_0 . Neste estudo nós utilizamos o IMC. Posteriormente, os indivíduos foram depositados na Coleção Científica de Anfíbios da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, UNOCHAPECÓ (Licença SISBIO nº 56259-1).

Temperatura do ar e URA foram obtidos usando termohigrômetro digital (Instrutherm, modelo HT-300), pH foi obtido usando um pHmetro de bolso (Alfakit, modelo AT-315) e temperatura da água foi obtida usando termômetro de mercúrio. A área da lagoa foi calculada usando a área de polígono, com auxílio do *Google Earth* (versão 7.1.7.2606). Nos ranários, consideramos a área da baía de coleta, usando as medidas de comprimento (m) x largura (m). A densidade foi calculada pela seguinte expressão: $DA = n/A$, onde DA = Densidade Absoluta, n = número de indivíduos e A = área. O comprimento rostro-cloacal (CRC) e a massa (g) foram obtidos com auxílio de balança (0,1 g) e paquímetro (0,01 mm). A identificação do sexo foi baseada na coloração da região gular e tamanho do tímpano (amarelos nos machos e brancos nas fêmeas) e tamanho do tímpano (proporcionalmente maior nos machos).

Para a extração de DNA das amostras, seguimos o procedimento proposto por Boyle et al. (2004) e as alterações feitas por Lambertini et al. (2013). Para cada *ependorf* contendo o *swab*, utilizamos 50 μ l de PrepMan™ ULTRA Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems by Life Technologies). Após a adição do reagente em cada *ependorf*, os tubos foram agitados em vortex por 45 segundos, centrifugados por 30 segundos a 12.000 RPM. Aquecidos em banho com água fervente por 10 minutos, resfriado em temperatura ambiente por 2 minutos, e centrifugados novamente por 1 minuto a 12.000 RPM. Os *swabs* foram invertidos dentro do *ependorf* utilizando pinças flambadas a cada inversão e centrifugados por 5 minutos a 12.000 RPM. Após isso, os *swabs* foram descartados e os *ependorfs* foram centrifugados rapidamente (por alguns segundos) e aproximadamente 45 μ L da solução foram transferidos para novos tubos. Centrifugamos por 10 minutos a 12.000 RPM e preparamos uma diluição de 1:10 do material genético que foi estocado (LAMBERTINI et al., 2013). O material genético permaneceu estocado em freezer à temperatura de -22°C.

Para realizar o qPCR, em uma placa de 96 poços preparamos um “reaction master mix” contendo: 1250 μ L de Taqman Master Mix (Applied Biosystems®), 125

μL do *primer* (BOYLE et al., 2004) ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') concentrado à 18 μM , 125 μL do *primer* 5.8S Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA-3') concentrado à 18 μM , 125 μL da sonda ChytrMGB2 (5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3') concentrada à 5 μM , 275 μL de água destilada, e 100 μL de BSA (Bovine Albumin Serum / Soro Albumina Bovina). Para preparação da placa de qPCR adicionamos 20 μL do mix em cada poço da placa e 5 μL do DNA extraído e diluído a 1:10. Adicionamos DNA de uma cepa padrão (CFLT 159) em concentrações conhecidas e nas diluições 10^3 , 10^2 , 10, 1 e 10^{-1} equivalentes genômicos (sendo os dois últimos em duplicata) para a construção da curva padrão nos sete poços da primeira e segunda coluna da placa. Preparamos também o controle negativo sem DNA (água destilada) no último poço da primeira e segunda coluna da placa. Somente consideramos um indivíduo infectado (*Bd*⁺) aquele com pelo menos um equivalente genômico (e.g.) de zoósporo de *Bd* (KRIGER et al., 2007) e, após as análises, os valores de e.g. foram arredondados para números íntegros.

2.3 Análise de dados

A prevalência de infecção foi calculada a partir da proporção de indivíduos positivos para *Bd* em relação ao número total de indivíduos amostrados, em cada local de amostragem. Para medir a intensidade da infecção foi considerado o número de e.g. por *swab*. Foi feito o cálculo multiplicando os valores de e.g. que resultaram do qPCR pelo fator de diluição utilizado na extração de DNA.

Utilizamos teste *t* para testar a prevalência de infecção em rã-touro entre os ranários e ambientes naturais e ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey para analisar a prevalência de infecção em relação ao tipo de manejo adotado entre os ranários (manejo aberto/manejo fechado). Para testar se variação na carga de zoósporos diferia entre ranários e ambientes naturais, utilizamos o teste Wilcoxon e para verificar a variação na carga de zoósporos entre todos os locais amostrados utilizamos teste *Kruskal-Wallis*.

Testamos a prevalência de infecção em relação à categorias de distância (em km) de ranários, usando o teste *t* e a variação na carga de zoósporos em relação às categorias de distância (em km) com teste de *Kruskal-Wallis*. Para isso, categorizamos as distâncias em duas classes: 0,1-10 e 40-80 km. Nós utilizamos o

teste *t* para analisar a influência do sexo na variação na carga de zoósporos e também a influência da classe de idade (adultos e juvenis) na carga de zoósporos.

Para testar a influência do IMC dos indivíduos na carga de zoósporos realizamos regressão linear simples e para verificar se o IMC influenciou na presença de zoósporos, utilizamos o teste *Wilcoxon*. Para testar a influência das variáveis ambientais (pH, temperatura do ar e da água e umidade relativa do ar) na carga de zoósporos realizamos regressões lineares múltiplas, considerando ranários e ambientes naturais, separadamente.

Para todas as análises, verificamos a normalidade dos dados utilizando teste de *Shapiro-Wilk*. A carga de zoósporos foi transformada em números logarítmicos, devido a grande amplitude de variação. As análises foram realizadas com auxílio do programa R (R Core Team, 2017) e o nível de significância considerado em todos os testes foi $P \leq 0,05$ (ZAR, 1999).

3 RESULTADOS

Encontramos indivíduos de rã-touro infectados por *Bd* em todos os ranários e lagoas em ambiente natural, situadas próximas ou distantes dos ranários (Figura 1).

Do total de 276 amostras analisadas, 182 (65,9%) foram positivas para *Bd* (Tabela 2), sendo 88 indivíduos (72,7%) de ranários e 94 indivíduos (60,6%) de ambiente natural. A prevalência de indivíduos infectados não diferiu entre ranários e ambiente natural ($t_{(9,55)} = 1,10$; $P = 0,29$; Figura 2A). Nos ranários, a prevalência variou de 25 (5/20) a 100% (20/20) e em ambiente natural de 27 (3/11) a 90% (18/20) (Tabela 2).

Os ranários com manejo “aberto”, apresentaram maior prevalência de infecção do que ranários com manejo “fechado” ($F_{(1)} = 10,7$; $P = 0,03$; Figura 2B).

A carga de zoósporos de indivíduos *Bd+* variou de 1 a 156.176 (78.088 ± 110.432) zoósporos. A maioria ($n = 108$; 59,3%) apresentou uma carga abaixo de 100 zoósporos e apenas um indivíduo (0,54%) apresentou carga acima de 100.000 zoósporos (Tabela 3). A carga de zoósporos não diferiu entre ranários e ambientes naturais ($W = 3901$, $P = 0,50$; Figura 2C). No entanto, houve diferença na variação da carga de zoósporos entre localidades ($H_{(13)} = 65,48$; $P < 0,01$; Figura 2D).

A prevalência e a carga de zoósporos de indivíduos infectados por *Bd* de lagoas no entorno de ranários (0,1 - 10 km) não diferiu da prevalência ($t_{(5,99)} = -0,66$; $P = 0,52$; Figura 3A) e da carga de zoósporos ($H_{(1)} = 1,92$; $P = 0,16$; Figura 3B) de indivíduos de lagoas mais distantes (40 - 80 km), sem influência direta de ranários.

Em ambiente natural, as fêmeas apresentaram carga de zoósporos maior do que os machos ($t_{(33,86)} = 2,23$; $P = 0,03$; Figura 4A), mas a carga de zoósporos não diferiu entre juvenis e adultos ($t_{(73,04)} = -0,46$; $P = 0,64$; Figura 4B). A carga de zoósporos não influenciou no IMC ($R^2 = 0,26$; $P = 0,58$; Figura 4C) e também não diferiu na presença de zoósporos ($W = 2861$; $P = 0,92$; Figura 4D).

Nos ranários, a carga de zoósporos foi positivamente influenciada pelo pH, temperatura do ar e da água e nos ambientes naturais, apenas pela temperatura da água. A umidade relativa do ar não influenciou na carga de zoósporos (Tabela 4).

Tabela 2. Carga de zoósporos e prevalência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em ranários e ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. RA = ranário; LA = lagoa em ambiente natural. A carga de zoósporos está representada como média \pm desvio padrão e amplitude. A prevalência é apresentada como porcentagem (indivíduos positivos/indivíduos amostrados).

Local	Carga de zoósporos	Prevalência
RA01	625 \pm 1070 (6 - 3029)	80% (16/20)
RA02	11 \pm 9 (3 - 40)	71% (15/21)
RA03	250 \pm 378 (4 - 1359)	100% (20/20)
RA04	75 \pm 122 (3 - 391)	65% (13/20)
RA05	4 \pm 2 (3 - 7)	25% (05/20)
RA06	3788 \pm 9292 (19 - 39738)	100% (20/20)
LA01	10979 \pm 18389 (4 - 32209)	27% (03/11)
LA02	2358 \pm 5924 (3 - 21875)	70% (14/20)
LA03	828 \pm 2193 (2 - 6249)	38% (08/21)
LA04	1363 \pm 3566 (1 - 14395)	75% (15/20)
LA05	45 \pm 65 (2 - 175)	38% (08/21)
LA06	11 \pm 14 (1 - 40)	50% (10/20)
LA07	5181 \pm 10971 (3 - 35038)	90% (18/20)
LA08	9401 \pm 37826 (3 - 156176)	77% (17/22)
		(66%)182/276

Tabela 3. Número de indivíduos positivos para *Bd*, intervalo da carga de zoósporos e porcentagem (indivíduos positivos por intervalo/indivíduos positivos), em rã-touro em ranários e ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017.

Indivíduos <i>Bd</i> +	Carga de zoósporos	%
108	<100	59,3
46	101 – 1.000	25,3
20	1.001 – 10.000	11,0
7	10.001 – 100.000	3,8
1	>100.000	0,6
182		100,0

Tabela 4. Influência de variáveis ambientais sobre a carga de zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em ranários e ambientes naturais, na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. F = valores da regressão linear múltipla; Valores de P significativos ($\leq 0,05$) estão indicados em negrito.

Variáveis ambientais	Carga de Zoósporos	Erro padrão	F	P
Ranários				
Ph	1499,93	726,53	2,065	0,040*
Umidade relativa do ar	58,43	80,77	0,723	0,470
Temperatura do ar	1091,16	424,96	2,509	0,014*
Temperatura da água	-2516,97	1094,75	-2,299	0,024*
Ambientes naturais				
Ph	0,31635	0,53445	0,592	0,555
Umidade relativa do ar	-0,01138	0,02863	-0,398	0,691
Temperatura do ar	0,03550	0,09048	0,392	0,695
Temperatura da água	-0,41407	0,13064	-3,170	0,002**

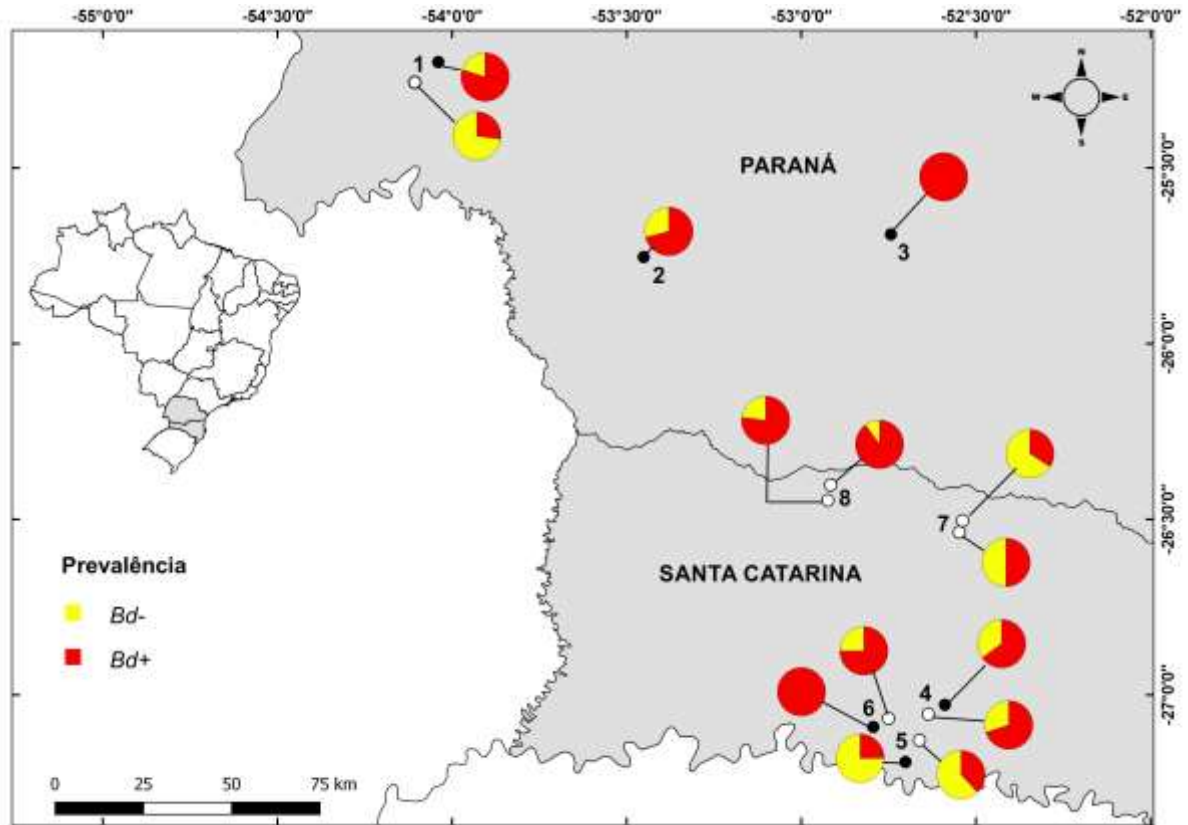


Figura 1. Pontos de amostragem em lagoas naturais (pontos brancos) e ranários (pontos pretos) onde indivíduos de rã-touro foram amostrados para prevalência e carga de *Batrachochytrium dendrobatidis* nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil. 1 = Medianeira; 2 = Santa Izabel do Oeste; 3 = Sulina; 4 e 5 = Chapecó; 6 = Guatambu; 7 = São Domingos; 8 = São Lourenço do Oeste.

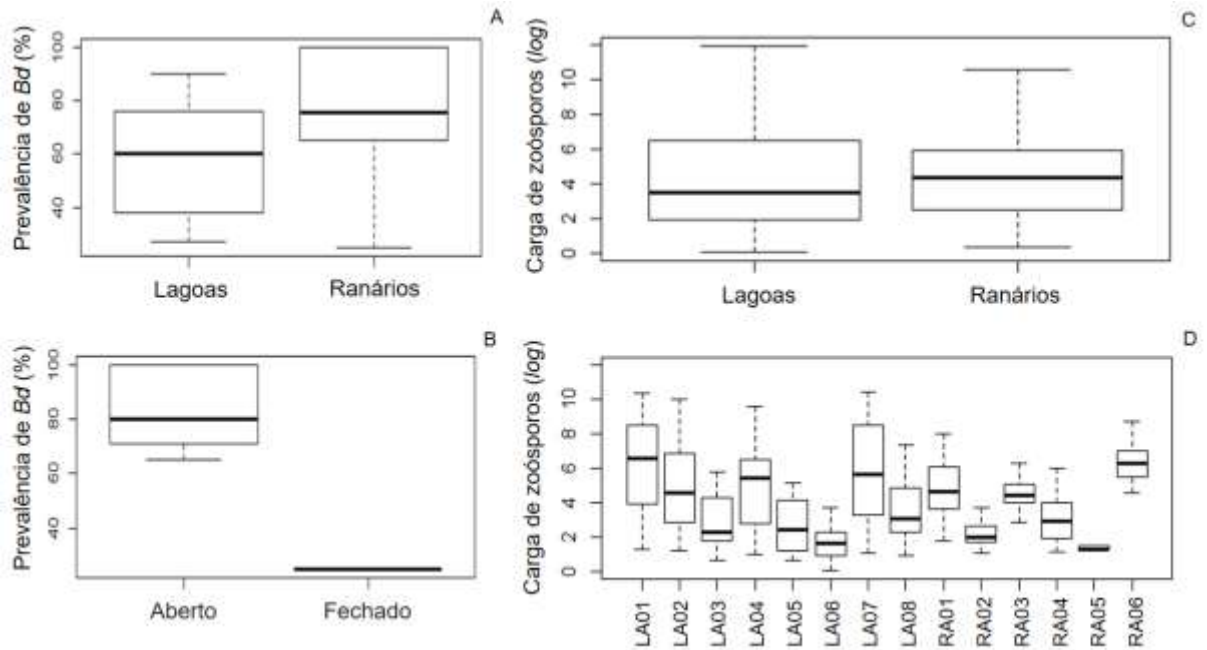


Figura 2. Prevalência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em ranários e ambiente natural (A) e em relação ao tipo de manejo (“aberto” ou “fechado”) em seis ranários (B). Variação na carga de zoósporos (em log) de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro, por ambiente de amostragem (C) e por localidade de coleta (D), na região sul do Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. A descrição das abreviações das localidades amostradas se encontram na Tabela 1.

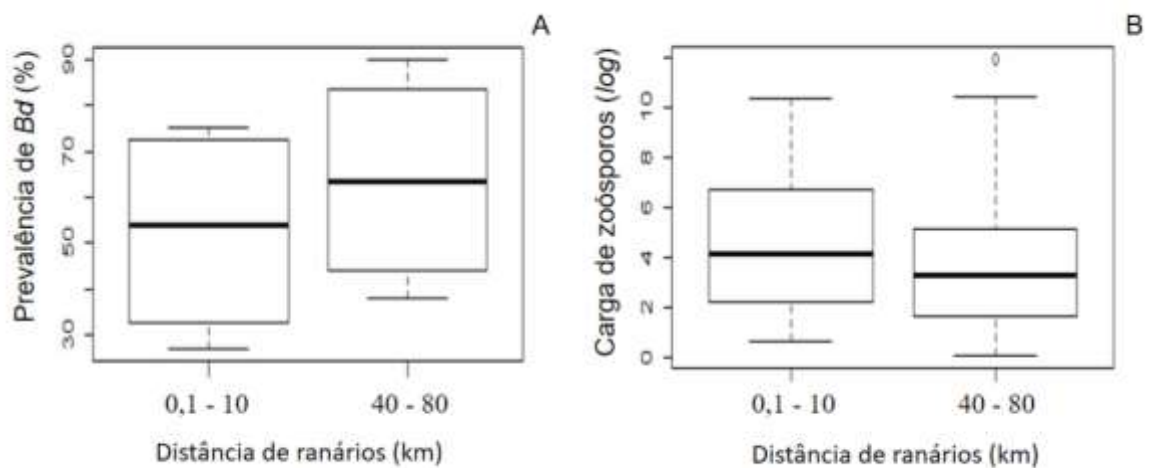


Figura 3. Prevalência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro de lagoas naturais, em relação à distância de ranários (A), e variação na carga de zoósporos (em log) em relação à distância de ranários (B) localizados nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017.

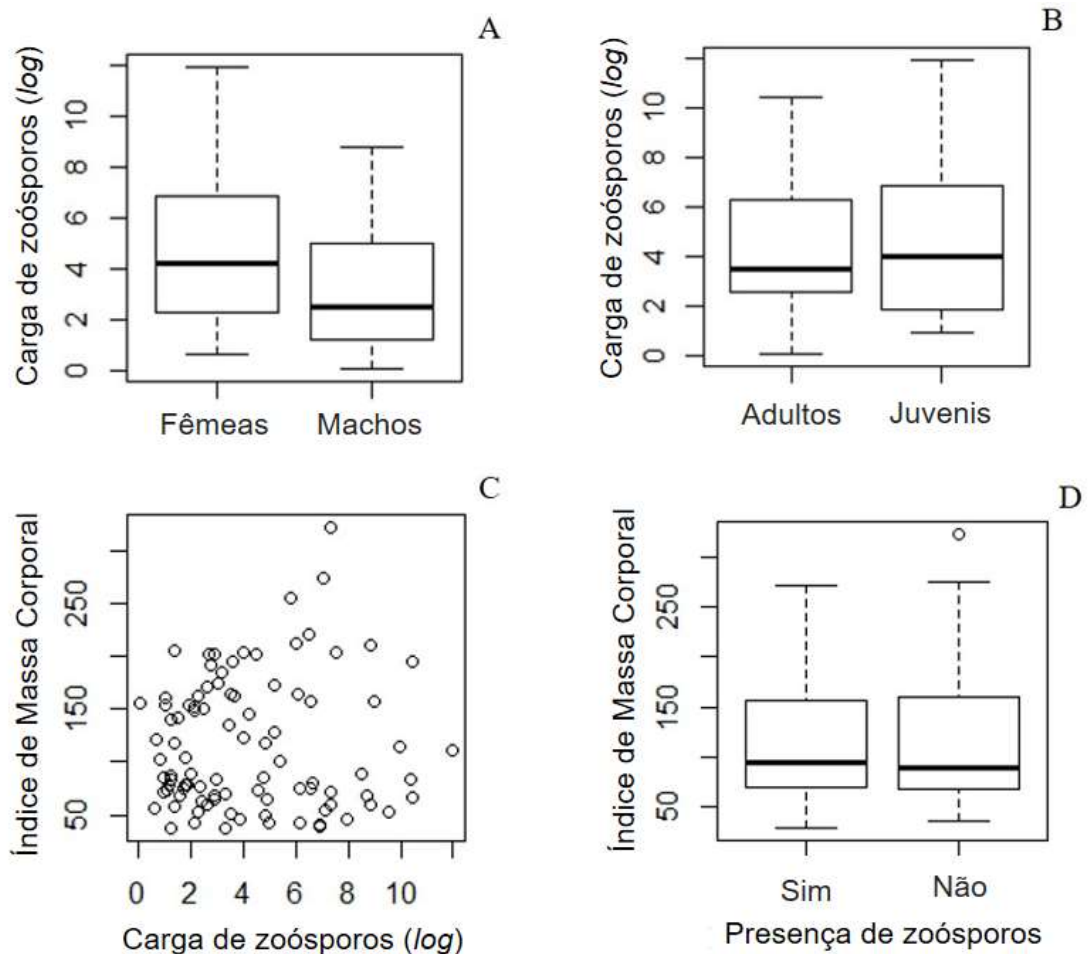


Figura 4. Variação na carga de zoósporos (em *log*) de *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro em relação ao sexo (A), faixa etária (B), variação na Índice de Massa Corporal (IMC) em relação à carga de zoósporos (em *log*) (C) e Índice de Massa Corporal (IMC) em relação à presença de zoósporos (D), em ambientes naturais nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil, no período de setembro de 2016 a maio de 2017.

4 DISCUSSÃO

Nós registramos uma elevada prevalência de *Bd* em rã-touro e uma intensidade de infecção semelhante entre indivíduos de cativeiro e de vida livre. A ocorrência de indivíduos *Bd*⁺ em todas as localidades amostradas, sugere que zoósporos do fungo estão presentes em todas as áreas de Mata Atlântica em que a

rã-touro ocorre, independente da densidade populacional desta espécie nos ambientes ou de fatores ambientais associados. Considerando que populações de rã-touro ocorrem em diversas localidades no sul do Brasil (BOTH et al., 2011) e que as condições climáticas favorecem o seu estabelecimento e dispersão (GIOVANELLI et al., 2008), é provável que os anfíbios que se encontram nestes ambientes também estejam infectados por *Bd*.

A alta prevalência de *Bd* associada com o comércio de rã-touro aumenta o fluxo gênico de linhagens virulentas (SCHLOEGEL et al., 2012; O'HANLON et al., 2018). Desta forma, como existe uma produção intensiva da rã-touro na região sul do Brasil (BOTH et al., 2011; SCHLOEGEL et al., 2009), é muito provável que as populações de anfíbios nativos da região sul do Brasil estejam sendo influenciadas pela possibilidade de escapes de rãs-touro infectadas. Outros estudos têm demonstrado que a rã-touro apresenta alta prevalência de *Bd*, podendo ser maior do que outras espécies nativas (BEYER, et al., 2015; MARHANKA et al., 2017). A ampla ocorrência e capacidade de rápida expansão na área de ocupação, associada à elevada prevalência encontrada neste estudo, reforça a hipótese de que a rã-touro está atuando como reservatório e vetor de quitridiomiose (MAZZONI et al., 2003; HANSELMANN et al., 2004; GAHL et al., 2008; GREENSPAN et al., 2012; MARTEL et al., 2013; BEYER et al., 2015; O'HANLON et al., 2018) no sul do Brasil.

Os ranários com manejo aberto apresentaram maior prevalência de *Bd*. Considerando que apenas um dos ranários amostrados apresentou manejo fechado, seria necessário aprofundar os estudos em ranários, visando esclarecer melhor a influência do tipo de manejo na prevalência de *Bd*. Mesmo assim, é importante destacar que essa diferença encontrada, indica que a manutenção das rãs somente em cativeiro, sem contato com as lagoas do entorno, faz com que a prevalência de zoósporos permaneça baixa, e conseqüentemente, interrompe a ligação entre fungos do ranário e do ambiente natural. No entanto, com elevada prevalência é muito provável que esses ranários possam atuar como fonte constante de entrada de patógenos no ambiente natural (MAZZONI et al., 2003). A entrada de zoósporos pode ser tanto por meio de escapes de animais, quanto por efluentes contaminados, uma vez que estes são destinados ao ambiente natural sem tratamento. Além disso, deve ocorrer também uma constante troca de cepas de *Bd* entre ranários e ambiente natural, seja pela água residual, água captada para a criação (MAZZONI et al.,

2003) ou movimentação dos indivíduos. O comércio de anfíbios faz com que os zoósporos sejam transportados de um local para outro, ultrapassando barreiras naturais (KOLBY e DASZAK, 2016; O'HANLON et al., 2018). Desta forma, pode facilitar a circulação do patógeno em diferentes ambientes, podendo resultar na hibridação de linhagens de *Bd*, oportunamente culminando em linhagens com maior virulência (SCHLOEGEL et al., 2012; JENKINSON et al., 2016; O'HANLON et al., 2018), representando maior perigo às espécies nativas.

As cargas similares de zoósporos entre os ranários e ambientes naturais indicam que o patógeno pode sobreviver em diferentes condições ambientais (SONN et al., 2017) e o controle da infecção de *Bd* em rã-touro pode estar relacionado à tolerância da espécie em relação ao fungo (BEYER, et al., 2015; SONN et al., 2017). Além disso, encontramos uma carga baixa de infecção, com apenas 5% dos indivíduos com mais de 10.000 zoósporos. Cargas de zoósporos abaixo de 10.000 são consideradas infecções com baixo risco de morte (VREDENBURG et al., 2010; KINNEY et al., 2011), embora este padrão não é aplicável para todas as espécies (PREUSS et al., 2016; HORNER et al., 2017). A baixa carga de zoósporos em rã-touro parece comum tanto em condições naturais quanto em condições de laboratório (GREENSPAN et al., 2012; GERVASI et al., 2013; ESKEW et al., 2015). Esta característica, possivelmente se deve à mecanismos de tolerância, que devem impedir estágios avançados da infecção, facilitando a permanência do fungo (ESKEW et al., 2015). Outras espécies também têm apresentando condições semelhantes, de alta prevalência e baixa intensidade de zoósporos (HORNER et al., 2017).

Por outro lado, nós encontramos variação na carga de zoósporos entre os locais, sendo alguns em ambiente natural com elevadas cargas totais, o que denota que variações ambientais apresentam algum tipo de interferência. A variação nas características físicas e químicas, comum nos ambientes naturais, podem propiciar variações temporais e espaciais dos zoósporos, que ainda precisam ser melhor compreendidas. Neste sentido, condições de cativeiro, mesmo que temporalmente, podem resultar em cargas mais estáveis e conseqüentemente, o não desenvolvimento de sinais clínicos da doença. Considerando que encontramos menor prevalência e conseqüentemente menor carga de zoósporos em ranário com manejo fechado, o tipo de manejo adotado nos criadouros pode ser um fator que

influencia fortemente nesta variação. Além disso, diferentes cepas do patógeno podem também exercer algum tipo de influência (PIOVIA-SCOTT et al., 2015), pois cepas mais virulentas podem representar maiores riscos aos anfíbios. Além do mais, a tolerância da rã-touro à quitridiomycose é importante, pois mantendo uma baixa intensidade de infecção, a espécie pode manter maior densidade populacional e assim promover a infecção e reinfeção contínua nos indivíduos que se encontram no ambiente (BRIGGS et al., 2010). Desta forma, diversos fatores podem estar atuando em sinergia, resultando em variação na carga de zoósporos.

A prevalência e a carga de zoósporos não foram influenciadas pela distância das lagoas em relação aos ranários. Assim, indivíduos de lagoas próximas de ranários, que poderiam eventualmente ter escapado ou sido liberados para o ambiente natural, não possuem cargas mais elevadas do que indivíduos que se encontram em lagoas mais distantes dos ranários. Aparentemente, o papel dos ranários está mais relacionado com a ampliação da ocorrência e como fonte constante de entrada de rã-touro e do patógeno nos ambientes naturais do que como potencializador de zoósporos do fungo.

A carga de infecção em indivíduos de rã-touro nos ambientes naturais também pode ser influenciada por fatores climáticos (BEYER et al., 2015). Nós encontramos influência do pH, temperatura do ar e da água na carga de zoósporos nos ranários e influência da temperatura da água nos ambientes naturais. Os valores de pH, temperatura do ar e da água de ambos os ambientes, ranários e lagoas naturais, foram similares aos considerados ideais para a ranicultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2008; MERCANTE et al., 2014). Neste estudo, nós registramos a média da temperatura da água próxima dos 26°C, ideais para os anfíbios (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2008) e também para a carga de *Bd* (PIOTROWISK et al., 2004; VOYLES et al., 2017), nesta faixa de temperatura (RÖDDER et al., 2013). As condições de pH, temperatura do ar e da água dos ranários podem ajudar a manter cargas baixas de zoósporos, mesmo que não sejam suficientes para eliminar o fungo (RÖDDER et al., 2013). Nos ambientes naturais, altas temperaturas e períodos mais secos podem influenciar na diminuição da infecção (WOODHAMS et al., 2003; KINNEY et al., 2011). Além disso, a composição genética do hospedeiro, a resposta imunológica (VAN ROOIJ et al., 2015), o *stress* fisiológico (RICHARDS-ZAWACKI, 2010), a composição da microfauna aquática (SCHMELLER et al., 2014)

e a comunidade de macro invertebrados (SEARLE et al., 2013), podem resultar em diferentes interações entre o patógeno e o hospedeiro. As variações nas condições climáticas podem inibir o sistema imunológico dos anfíbios, tornando-os mais susceptíveis à infecção por *Bd* (RAFFEL et al., 2012). Assim, embora exista uma variação na carga de zoósporos de acordo com a temperatura, sendo as temperaturas mais elevadas relacionadas com as menores cargas, a sobrevivência do indivíduo parasitado com *Bd* vai ser determinada pela resposta de seu sistema imune (SONN et al., 2017). Além disso, a manutenção da microbiota normal na pele da rã-touro, potencializa a sua aptidão como hospedeiro do fungo *Bd* (WALKE et al., 2015), ajudando na resistência à doença. Desta forma, a carga de zoósporos de *Bd* em rã-touro parece ser explicada por um conjunto de fatores, tanto relacionados às condições do ambiente, como às características individuais, como o sistema imunológico (ADAMS et al., 2017).

Encontramos que as fêmeas apresentaram maiores cargas de infecção do que os machos, da mesma forma que outras espécies também apresentaram diferenças entre os sexos. Isto tem sido atribuído a fatores fisiológicos associados ao *stress* ou ao contato com outros indivíduos infectados (ADAMS et al., 2017). Por outro lado, não encontramos diferenças na carga de zoósporos entre jovens e adultos de rã-touro. É possível que níveis baixos de infecção sejam mantidos desde o período larval (MAZZONI et al., 2003; GERVASI et al., 2013), contribuindo para a baixa taxa de mortalidade. Ao contrário, algumas espécies resistentes na fase larval apresentam elevados índices de mortalidades na fase adulta (RACHOWICZ e VREDENBURG, 2004; VAN ROOIJ et al., 2015). Sendo os juvenis resistentes, podem atuar como dispersores mais eficientes do fungo do que adultos (RACHOWICZ e VREDENBURG, 2004), pois as larvas podem apresentar maior mobilidade no ambiente natural, facilitado pelo transporte por ambientes lóticos (SEPULVEDA et al., 2015). Também não encontramos uma relação positiva entre o IMC dos indivíduos e a presença de zoósporos de *Bd*. Como a infecção por *Bd* não está produzindo debilidade física nos indivíduos de rã-touro infectados, possivelmente outros fatores como a microbiota presente na pele possam estar ajudando a manter níveis baixos de infecção (WALKE et al., 2015), resultando na sua tolerância ao *Bd*.

A ampla ocorrência de rã-touro nos ambientes naturais da região estudada e a elevada prevalência de *Bd* sugere que, estando presente no ambiente natural, a rã-touro serve como reservatório de *Bd* (ESKEW et al., 2015). Desta forma, as espécies nativas estão susceptíveis tanto à contaminação com *Bd* como também a diversos outros tipos de interações negativas, como a competição e predação, relacionadas à presença de rã-touro (OLIVEIRA et al., 2016c; ADAMS et al., 2017). Além disso, o manejo adotado na maioria dos ranários desta região é um ponto crítico, pois o manejo aberto não oferece controle de escapes de animais para o ambiente natural, facilitando o estabelecimento da espécie em novas áreas. Neste sentido, sugerimos a adoção de protocolos rigorosos de rotina em ranários que incluam análises de *Bd*, inclusive em indivíduos comercializados, visando promover a conservação das espécies nativas (WINTERS et al., 2014). Sugerimos ainda, a inclusão de medidas profiláticas obrigatórias para a manutenção de rã-touro de cativeiro. A profilaxia deve levar em conta os locais, equipamentos e utensílios utilizados, uma vez que esses também são contaminados (JOHNSON e SPEARE, 2003).

Desta forma, ressaltamos a importância da manutenção de programa nacional de monitoramento de invasões biológicas como um elemento chave para a gestão tanto em escala nacional e regional (LATOMBE et al., 2016). Sugerimos que sejam adotadas medidas urgentes de fiscalização e regulamentação mais rígida dos ranários de todo Brasil, ou mesmo de outras partes do mundo, tornando a ranicultura uma atividade menos prejudicial à fauna nativa.

São necessários mais estudos sobre o impacto direto e indireto da invasão de rã-touro sobre as populações nativas, considerando a disseminação de doenças, predação e competição (KRAUS, 2015; ADAMS et al., 2017). Estudos que identifiquem as diferentes cepas de *Bd* (e.g., JENKINSON et al., 2016) também poderão contribuir para explicar a origem e distribuição de linhagens virulentas, que podem ocorrer em um região. A variação entre as cepas de *Bd* é reflexo da adaptação aos ambientes locais, que podem facilitar a transmissão do *Bd* em algumas populações (LAMBERTINI et al., 2016). Desta forma, a compreensão dos padrões da dinâmica entre patógeno e hospedeiro é essencial para minimizar os efeitos deletérios de doenças emergentes em espécies potencialmente susceptíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Técnica do Laboratório de Genética da UNOCHAPECÓ, que auxiliou na extração de DNA. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES / PROSUC nº 88887.153984 / 2017-00) concedeu bolsa de estudos à RCS. LFT, LPR e MRP foram apoiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 2016 / 25358-3; nº 2016 / 03344-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq nº 300896 / 2016-6) e Coordenação Melhoria do Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos também à ICMBio pela permissão de coleta (nº 56259-1).

REFERÊNCIAS

ADAMS, A. J.; KUPFERBERG, S. J.; WILBER, M. Q.; PESSIER, A. P.; GREFSRUD, M.; BOBZIEN, S.; VREDENBURG, V. T.; BRIGGS, C. J. Extreme drought, host density, sex, and bullfrogs influence fungal pathogen infection in a declining lotic amphibian. **Ecosphere**, v. 8, n. 3, p. e01740, 2017.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

BECKER C. G.; FONSECA C. R.; HADDAD C. F. B.; BATISTA R. F.; PRADO P. I. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, p. 1775–1777, 2007.

BELLARD, C.; BERTELSMEIER, C.; LEADLEY, P.; THUILLER, W.; COURCHAMP, F. Impacts of climate change on the future of biodiversity. **Ecology Letters**, v. 15, p. 365–377, 2012.

BELLARD, C.; LECLERC, C.; LEROY, B.; BAKKENES, M.; VELOZ, S.; THUILLER, W.; COURCHAMP, F. Vulnerability of biodiversity hotspots to global change. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, p. 1376–1386, 2014.

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. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of

Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 95, p. 9031-9036, jul. 1998.

BEYER, S. E.; PHILLIPS, C. A.; SHOOLEY, R. L. Canopy cover and drought influence the landscape epidemiology of an amphibian chytrid fungus. **Ecosphere**, v. 6, n. 5, p. 1-18, mai. 2015.

BOONE, M. D.; LITTLE, E. E.; SEMLITSCH R. D. Overwintered Bullfrog tadpoles negatively affect salamanders and anurans in native amphibian communities. **Copeia**, p. 683–690, 2004.

BOTH, C.; LINGNAU, R.; SANTOS-JR, A.; MADALOZZO, B.; LIMA, L. P.; GRANT, T. Widespread occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. **South American of Herpetology Journal**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 2011.

BOYLE, D. G.; BOYLE, D. B.; OLSEN, V.; MORGAN, J. A. T.; HYATT, A. D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, p. 141-148, 2004.

BRIGGS, C. J.; KNAPP, R. A.; VREDENBURG, V. T. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians Cheryl. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9695–9700, 2010.

CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. **Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. Proceedings of the Royal Society of London, B: Biological Sciences**, v. 28, n. 1848, p. 20162254, 2017.

COLLINS, J. P.; CRUMP, M. L.; LOVEJOY, T. E. Extinction in our times: Global amphibian decline. **Oxford, UK: Oxford University Press**, 2009.

CRAWFORD, A. J.; LIPS, K. R.; BERMINGHAM, E. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 13777–13782, 2010.

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

DASZAK, P.; STRIEBY, A.; CUNNINGHAM, A. A.; LONGCORE, J. E.; BROWN, C. C.; PORTER, D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. **Herpetological Journal**, v. 14, p. 201–207, 2004.

ESKEW, E. A.; WORTH, S. J.; FOLEY, J. E.; TODD, B. D. American Bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) resist infection by multiple isolates of *Batrachochytrium dendrobatidis*, including one implicated in wild mass mortality. **EcoHealth**, v. 13, n. 3, p. 513-518, 2015.

FICETOLA, G. F.; THUILLER, W.; MIAUD, C. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species – the american bullfrog. **Diversity and Distributions**, v.13, p. 476-485, 2007.

FORTI, L. R.; BECKER, C. G.; TACIOLI, L.; PEREIRA, V. R.; SANTOS, A. C. F. A.; OLIVEIRA, I.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. Perspectives on invasive amphibians in Brazil. **PloSOne**, v. 12, n. 9, p. e0184703, 2017.

GAHL, M. K.; CALHOUN, A. J. K. Landscape setting and risk of Ranavirus mortality events. **Biological Conservation**, v. 141, p. 2679–2689, 2008.

GARNER, T. W. J.; PERKINS, M. W.; GOVINDARAJULU, P.; SEGLIE, D.; WALKER, S.; CUNNINGHAM, A.; FISHER, M. C. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biology Letters**, v. 2, p. 455–459, mai. 2006.

GERVASI, S. S.; URBINA, J.; HUA, J.; CHESTNUT, T.; RELYEA, R. A.; BLAUSTEIN, A. R. Experimental evidence for american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). **EcoHealth**, v. 10, p. 166–171, 2013.

GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Predicting the potential distribution of the alien invasive american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. **Biological Invasions**, v. 10, p. 585-590, 2008.

Global Invasive Species Database - **GISD**, 2018. Disponível em: <<http://193.206.192.138/gisd/search.php>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

GREENSPAN, S. E.; CALHOUN, A. J. K.; LONGCORE, J. E.; LEVY, M. G. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via a bullfrog (*L. Catesbeianus*) vector. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48 n. 3, p. 575–582, 2012.

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

HANSELMANN, R.; RODRIGUEZ, A.; LAMPO, M.; FAJARDO-RAMOS, L.; AGUIRRE, A. A.; KILPATRICK, A. M.; RODRIGUES, J. P.; DASZAK, P. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. **Biological Conservation**, v. 120, p. 115-119, fev. 2004.

HORNER, A. A.; HOFFMAN, E. A.; TYE, M. R.; HETHER, T. D.; SAVAGE, A. E. Cryptic chytridiomycosis linked to climate and genetic variation in amphibian populations of the southeastern United States. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175843, 2017.

JENKINSON, T. S.; BETANCOURT ROMÁN, C. M.; LAMBERTINI, C.; VALENCIA-AGUILAR, A.; RODRIGUEZ, D.; NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; RUGGERI, J.;

BELASEN, A. M.; DA SILVA LEITE, D.; ZAMUDIO, K. R.; LONGCORE, J. E.; TOLEDO, L. F.; JAMES, T. Y. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. **Molecular Ecology**, v. 25, p. 2978–2996, 2016.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, Ago. 2003.

KAEFER, I. L.; BOELTER, R. A.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of the invasive bullfrog. **Annales Zoologica Fennici**, v. 44, p. 435-444, 2007.

KATS, L. B.; FERRER, R. P. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 99–110, 2003.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R.; MILLER, C. L. Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Ecology**, v. 78, p. 1752–1760, 1997.

KINNEY, V. C.; HEENEYER, J. L.; PESSIER, A. P.; LANNON, M. Seasonal Pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". **Plos One**, v. 6, n. 3, p. e16708, 2011.

KOLBY, J. E.; DASZAK, P. The emerging amphibian fungal disease, chytridiomycosis: a key example of the global phenomenon of wildlife emerging infectious diseases. **Microbiology Spectrum**, v. 4 n. 3, p. E110-0004-2015, 2016.

KRAUS, F. Impacts from invasive reptiles and amphibians. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 46, p. 75–97, 2015.

KRIGER, K. M.; PEREGLOU, F.; HERO, J. M. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. **Conservation Biology**, v. 21 n. 5, p. 1280–290, mai. 2007.

KUPFERBERG, S. J. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: The role of larval competition. **Ecology**, v. 78, p. 1736–1751, 1997.

LAMBERTINI, C.; BECKER, G.; JENKINSON, T.; RODRIGUEZ, C. D.; LEITE, D.; JAMES, T. Y.; ZAMUDIO, K. R.; TOLEDO, L. F. Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 15-21, 2016.

LAMBERTINI, C.; RODRIGUEZ, D.; BRITO, F. B.; LEITE, D. S.; TOLEDO, L. F. Diagnóstico do fungo Quitridio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Métodos em Herpetologia. **Herpetologia Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 12-17, mar. 2013.

LATOMBE, G.; PYSEK, P.; JESCHKE, J. M.; BLACKBURN, T. M.; BACKER, S.; CAPINHA, C.; COSTELLO, M. J.; FERNANDEZ, M.; et al. A vision for global

monitoring of biological invasions. **Biological Conservation**, v. 213, p. 295-308, 2017.

LIPS, K. R. Mass mortality of the anuran fauna at an upland site in Panama. **Conservation Biology**, v. 13, n. 1, p. 117–125, fev. 1999.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; DE POORTER, M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. **Invasive Species Specialist Group of the World Conservation Union**, Auckland, New Zealand, p. 1-12, 2000.

LOYOLA, J.; NABOUT, J. C.; TRINDADE-FILHO, J.; LEMES, P.; URBNA-CARDONA, J. N.; DOBROVOLSKI, R.; SAGNORI, M. D.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Climate change might drive species into reserves: a case study of the american bullfrog in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Alytes**, v. 29, p. 61-74. 2012.

MARHANKA, E. C.; WATTERS, J. L.; HURON, N. A.; MCMILLIN, S. L.; WINFREY, C. C.; CURTIS, D. J.; DAVIS, D. R.; FARKAS, J. K.; KERBY, J. L.; SILER, C. D. Detection of high prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians from Southern Oklahoma, USA. **Herpetological Review**, v. 48, n. 1, p. 70-74, 2017.

MARTEL, A.; ADRIAENSEN, C.; SHARIFIAN-FARD, M.; SLOUIJS, A. S. V. D.; LOUETTE, G.; BAERT, K.; CROMBAGHS, B.; DEWULF, J.; PASMANS, F. The absence of zoonotic agents in invasive bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in Belgium and the Netherlands. **EcoHealth**, v. 10, p. 344–347, 2013.

MAZZONI, R.; CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; APOLO, A.; PERDOMO, E.; SPERANZA, G. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 995-998, Ago. 2003.

MEDEIROS, C. I.; BOTH, C.; KAEFER, I. L.; CECHIN, S. Z. Reproductive phenology of the American Bullfrog in subtropical Brazil: photoperiod as a main determinant of seasonal activity. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, p. 1909-1921, mar. 2016. Suplemento 3.

MERCANTE, C. T. J.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M.; MORAES, M. A. B.; PEREIRA, J. S.; LOMBARDI, J. V. L. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) farming system: water quality and environmental changes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 9-11, 2014.

MESQUITA A. F. C.; LAMBERTINI C.; LYRA M.; MALAGOLI L. R.; JAMES T. Y.; TOLEDO L. F.; HADDAD C. F. B.; BECKER C. G. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. **Scientific Reports**, v. 7, p. 16605, 2017.

MIAUD, C.; DEJEAN, T.; SAVARD, K.; MILLERY-VIGUES, A.; VALENTINI, A.; GAUDIN, N. C. G.; GARNER, T. W. J. Invasive North American bullfrogs transmit lethal fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* infections to native amphibian host species. **Biological Invasions**, v. 18, p. 2299–2308, 2016.

- MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 601-611, 2005.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.
- O'HANLON, S. J.; RIEUX, A.; FARRER, R. A.; ROSA, G. M.; WALDMAN, B.; BATAILLE, A.; KOSCH, T. A.; et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, v. 360, p. 621-627, 2018.
- OLIVEIRA, I. S.; RÖDDER, D.; CAPINHA, C.; AHMADZADEH, F.; OLIVEIRA, A. K. C.; TOLEDO, L. F. **Assessing future habitat availability for coastal lowland Anurans in the Brazilian Atlantic Rainforest. Studies of Neotropical Fauna and Environment**, v. 51, n. 1, p. 45-55, 2016a.
- OLIVEIRA, I. S.; RIBEIRO, V. M.; PEREIRA, E. R.; VITULE, J. R. S.; Predation on native anurans by invasive vertebrates in the Atlantic Rain Forest, Brazil. **Oecologia Australis**, v. 20, n. 3, p.70–74, 2016b.
- OLIVEIRA, I. S.; RÖDDER, D.; TOLEDO, L. F. **Potential worldwide impacts of sea level rise on coastal-lowland anurans. North-Western Journal of Zoology**, v. 12, n. 1, p. 91-101, 2016c.
- OLSON, D. H.; AANENSEN, D. M.; RONNENBERG, K. L.; POWELL, C. I.; WALKER, S. F.; BIELBY, J.; GARNER, T. W. J.; WEAVER, G.; The *Bd* Mapping Group; FISCHER, M. C. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. 01–13, fev. 2013.
- PEIG J.; GREEN A. J. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. **Oikos**, v. 118, p. 1883-1891, 2009.
- PEARL, C. A.; ADAMS, M. J.; BURY, R. B.; McCREARY, B. Asymmetrical effects of introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) on native ranid frogs in Oregon, U.S.A. **Copeia**, p. 11–20, 2004.
- PIOVIA-SCOTT, J.; POPE, K.; WORTH, S. J.; ROSENBLUM, E. B.; POORTEN, T.; REFSNIDER, J.; ROLLINS-SMITH, L. A.; WELLS, H. L. REJMANEK, D.; LAWLER, S.; FOLEY, J. Correlates of virulence in a frog-killing fungal pathogen: evidence from a California amphibian decline. **The ISME Journal**, v. 9, p. 1570–1578, 2015.
- PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycological Society of America Stable**, v. 96, n. 1, p. 9-15, Jan./Fev. 2004.

PREUSS, J. F.; LAMBERTINI, C.; LEITE, D. S.; TOLEDO, L. F.; LUCAS, E. M. Crossing the threshold: an amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. **Studies on Neotropical fauna and environment**, v. 51, n. 1, p. 68-77, mar. 2016.

QUIROGA, L. B.; MORENO, M. D.; CATALDO, A. A.; ARAGÓN-TRAVERSO, J. H.; PANTANO, M. V.; OLIVARES, J. P. S. O.; SANABRIA, E. A. Diet composition of an invasive population of *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog) from Argentina. **Journal of Natural History**, p. 1-15, 2015.

RACHOWICZ, L. J.; VREDENBURG, V. T. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, p. 75-83, out. 2004.

RAFFEL, T. R.; ROMANSIC, J. M.; HALSTEAD, N. T.; McMAHON, T. A.; VENESKY, M. D.; ROHR, J. R. Disease and thermal acclimation in a more variable and unpredictable climate. **Nature Climate Change**, v. 3, p. 146–151, 2012.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org>. 2017.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSENA, A. C.; PONZONIB, F. J.; HIROTAC, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141–1153, 2009.

RICHARDS-ZAWACKI, C. L. Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. **Proceedings Biologic Sciences**, v. 277, p. 519–528, 2010.

RÖDDER, D.; SCHULTE, U.; TOLEDO, L. F. High environmental niche overlap between the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and invasive bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) enhance the potential of disease transmission in the Americas. **North-Western journal of zoology**, v. 9, n. 1, p. 178-184, 2013.

SCHLOEGEL, L. M.; HERO, J. M.; BERGER, L.; SPEARE, R.; MCDONALD, K.; DASZAK, P. The Decline of the Sharp-Snouted Day Frog (*Taudactylus acutirostris*): The First Documented Case of Extinction by Infection in a Free-Ranging Wildlife Species? **EcoHealth**, v. 3, p. 35-40, mar. 2006.

SCHLOEGEL, L. M.; FERREIRA, C. M.; JAMES, T. Y.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J. E.; HYATT, A. D.; YABSLEY, M.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; MASSONI, R.; DAVIES, A. J.; DASZAK, P. North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. **Animal Conservation**, v. 13, n. 1, p. 53-61, 2010.

SCHLOEGEL, L. M.; PICCO, A. M.; KILPATRICK, A. M.; DAVIES, A. J.; HYATT, A. D.; DASZAK, P. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North

American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1420-1426, jul. 2009.

SCHLOEGEL, L. M.; TOLEDO, L. F.; LONGCORE, J. E.; GREENSPAN, S. E.; VIEIRA, C. A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C. M.; HIPOLITO, M.; DAVIES, A. J.; CUOMO, C. A.; DASZAK, P.; JAMES, T. Y. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 5162-5177, jun. 2012.

SCHMELLER, D. S.; BLOOI, M.; MARTEL, A.; GARNER, T. W.; FISHER, M. C.; AZEMAR, F.; CLARE, F. C.; LECLERC, C.; JÄGER, L.; GUEVARA-NIETO, M.; LOYAU, A.; PASMANS, F. Microscopic aquatic predators strongly affect infection dynamics of a globally emerged pathogen. **Current Biology**, v. 24, p. 176–180, 2014.

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

SEARLE, C. L.; MENDELSON, J. R. III; GREEN, L. E.; DUFFY, M. A. Daphnia predation on the amphibian chytrid fungus and its impacts on disease risk in tadpoles. **Ecology Evolution**, v. 3, p. 4129–4138, 2013.

SEPULVEDA, A.; LAYHEE, M.; STAGLIANO, D.; CHAFFIN, J.; BEGLEY, A.; MAXELL, B. Invasion of American bullfrogs along the Yellowstone River. **Aquatic Invasions**, v. 10, n. 1, p. 69–77, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MORAIS, J. C. L.; STÉFANI, M. V. Comportamento alimentar e qualidade da água em tanques de criação de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus*. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 95-101, 2008.

SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; SPEARE, R.; CASHINS, S.; McDONALD, R.; PHILLOTT, D.; HINES, H. B.; KENYON, N. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **EcoHealth**, v. 4, p. 125-134, 2007.

SONN, J. M.; BERMAN, S.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L. Influence of Temperature on Chytridiomycosis In Vivo. **EcoHealth**, v. 14, p. 762–770, 2017.

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

VAN ROOIJ, P.; MARTEL, A.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. Chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. **Veterinary Research**, v. 46 p. 137, 2015.

VELOSO, H. P., RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro, **IBGE**. 1991.

- VIBRANS, A. C.; UHLMANN, A.; SEVEGNANI, L.; MARCOLIN, M. NAKAJIMA, N.; GRIPPA, C. R. BROGNI, E.; GODOY, M. B. Ordenação dos dados de estrutura da Floresta Ombrófila Mista partindo de informações do inventário florístico-florestal de Santa Catarina: resultados de estudo-piloto. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 511-523, out.-dez., 2008.
- VOYLES, J.; JOHNSON, L. R.; ROHR, J.; KELLY, R.; BARRON, C.; MILLER, D.; MINSTER, J.; ROSENBLUM, E. B. Diversity in growth patterns among strains of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* across extended thermal optima. **Oecologia**, v. 184, p. 363–373, 2017.
- VREDENBURG, V. T.; KNAPP, R. A.; TUNSTALL, T. S.; BRIGGS, C. J. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9689–9694, mai. 2010.
- WALKE, J. B.; BECKER, M. H.; LOFTUS, S. C.; HOUSE, L. L.; TEOTONIO, T. L.; MINBIOLE, K. P. C.; BELDEN, L. K. Community structure and function of amphibian skin microbes: na experimete with bullfrogs exposed to a Chytrid Fungus. **PLoS One**, v.10, n.10, p. e0139848, 2015.
- WINTERS, H. D.; ALBERTINI, K. M.; NEELY, L. E.; TAKAHASHI, M. K. Prevalence of the amphibian chytrid fungus among zoo and pet store collections in the Northeastern United States. **Herpetological Review**. v. 45, n. 2, p. 242-244, 2014.
- WOODHAMS, D. C.; ALFORD, R. A.; MARANTELLI, G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, p. 65–67, 2003.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Pearson Education India, 1999.

MATERIAL SUPLEMENTAR 1

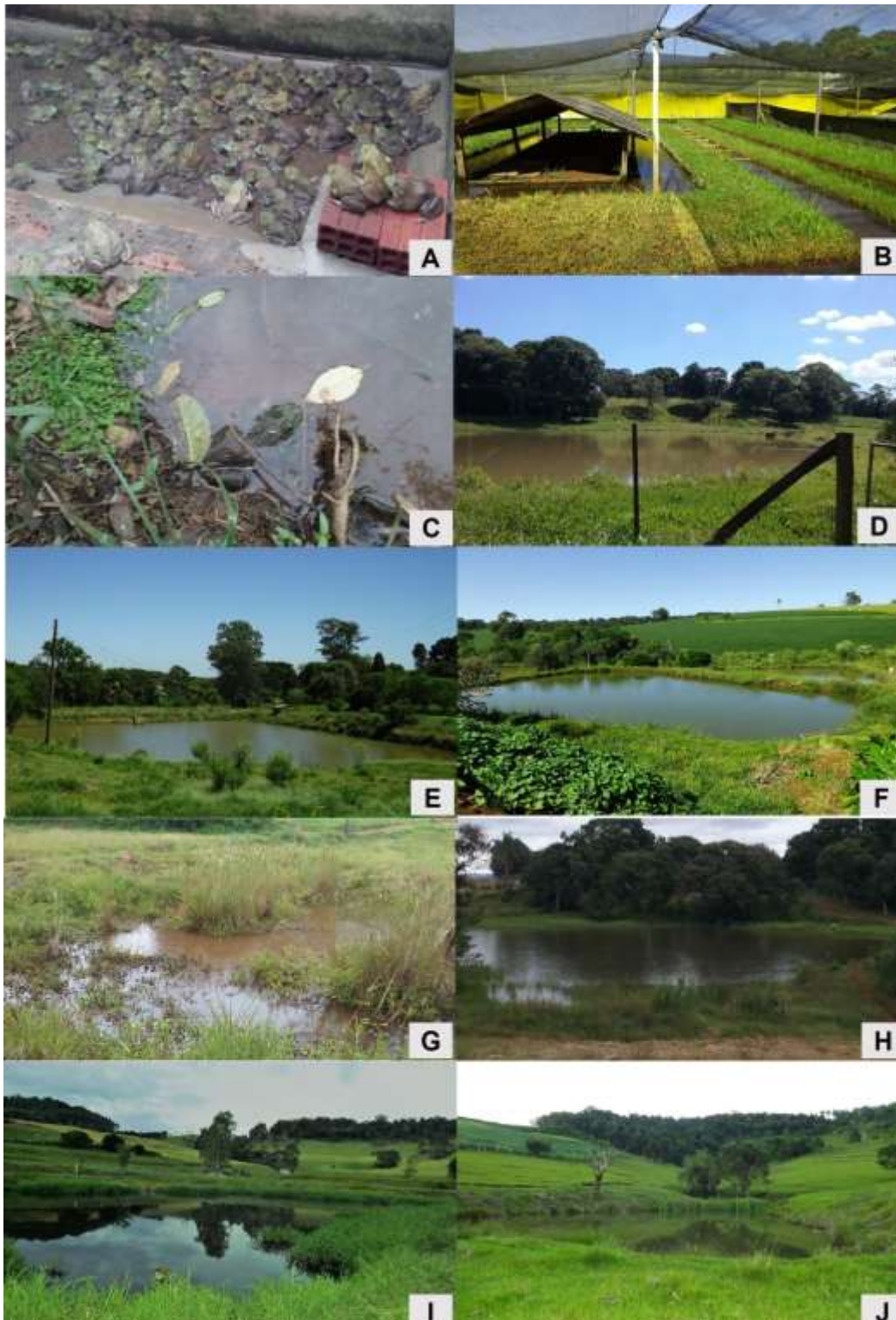


Figura S1. Lagoas em ambientes naturais e ranários com amostragem do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em rã-touro nos estados do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil. Medianeira/PR (A e C), Chapecó/SC (D e E), Guatambu/SC (B e F), São Domingos/SC (G e H) e São Lourenço do Oeste/SC (I e J).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo registrou indivíduos de rã-touro infectados por *Bd* em todas as localidades amostradas, ampliando as informações sobre a ocorrência de *Bd* e rã-touro no sul do Brasil. Registramos uma geralmente baixa carga de zoósporos em rã-touro, corroborando com a sugestão de que esta espécie atua como importante reservatório do fungo e provavelmente disseminadora eficiente de quitridiomicose na região de estudo.

Neste sentido, as espécies nativas de anfíbios da região sul do Brasil, que coocorrem com rã-touro, estão altamente susceptíveis à quitridiomicose, bem como, aos demais impactos negativos da presença de rã-touro nos ambientes, como competição e predação. Estudos futuros deveriam priorizar o monitoramento das populações de espécies nativas, no sentido de detectar prováveis declínios populacionais ou extinções locais relacionados a esses fatores. Ainda, o potencial de dispersão de *Bd* pela rã-touro necessita ser melhor compreendido, uma vez que outros fatores além do escape de indivíduos para os ambientes naturais, como o lançamento da água dos ranários para os ambientes aquáticos, também podem contribuir com a entrada de patógenos nos ambientes naturais.

Os ranários que adotam manejo incluindo lagoas naturais adjacentes oferecem um risco aumentado de disseminação do fungo para os ambientes naturais, pois existe uma fonte constante de reposição e troca de zoósporos entre cativeiro e ambiente natural. Adicionalmente, a troca de matrizes é prática comum entre ranários, podendo representar maiores riscos devido a troca de cepas *Bd*, com maior potencial de virulência (LAMBERTINI et al., 2016). Desta forma, as práticas de manejo em ranários devem incluir controle sanitário e de saída de indivíduos, além de monitoramento relacionado à identificação do fungo e esterilização, com tratamento da água.

Uma vez que as invasões biológicas de anfíbios estão se tornando mais complexas e generalizadas, é necessária a adoção de medidas imediatas, que contribuam para conservação da biodiversidade brasileira (FORTI et al., 2017). Neste sentido, outra ação importante é o fortalecimento de grupos de pesquisas e a divulgação de informações em espaços educativos formais e não formais (VERDADE et al., 2012).

REFERÊNCIAS

FORTI, L. R.; BECKER, C. G.; TACIOLI, L.; PEREIRA, V. R.; SANTOS, A. C. F. A.; OLIVEIRA, I.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. Perspectives on invasive amphibians in Brazil. **PloS One**, v. 12, n. 09, p. e0184703, 2017.

LAMBERTINI, C.; BECKER, G.; JENKINSON, T.; RODRIGUEZ, C. D.; LEITE, D.; JAMES, T. Y.; ZAMUDIO, K. R.; TOLEDO, L. F. Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. *Fungal Ecology*. **Fungal Ecology**, v. 20 p. 15-21, 2016.

VERDADE, V. K.; VALDUJO, P. H.; CARNAVAL, A. C.; SCHIESARI, L.; TOLEDO, L. F.; MOTT, T.; ANDRADE, P. C.; ETEROVICK, M. M.; PIMENTA, B. V. S.; NOGUEIRA, C.; LISBOA, C.; DE PAULA, C. D.; SILVANO, D. L. A leap further: the Brazilian amphibian conservation action plan. **Alytes**, v. 29, p. 27–42, 2012.