

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Correlatos ecológicos da quitridiomiose em anuros do
Cerrado**

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA RAMALHO

**Brasília-DF
2015**

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Correlatos ecológicos da quitridiomiose em anuros do Cerrado

Orientador: Guarino Rinaldi Colli

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília como
parte dos requisitos necessários para a obtenção
do título de Doutor em Biologia Animal

Brasília-DF

2015

Essa tese é inteiramente dedicada à
Hilda de Oliveira Ramalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família pelo incessante apoio;

Ao meu pai, Geraldo Cavalcante Ramalho pelo carinho, atenção, amor, apoio e cuidado;

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Adriana e à minha linda afilhada Isadora pela felicidade que trazem à minha vida;

Ao Gui Maffia pela parceria, companheirismo e amor;

Ao meu orientador, Guarino Rinaldi Colli por ter caminhado comigo nesses cinco anos de tanto aprendizado. Agradeço por tudo que me ensinou;

À Cristine Barreto pelo imenso auxílio nas análises laboratoriais;

Ao meus amigos Jéssica Fenker e Leonardo Tedeschi, Renata Françoso e Reuber Brandão, Alison Gainsbury, Tânia, Fabrícus e Marina por me acompanharem trazendo alegria à dura jornada do doutorado;

Aos queridos da CHUNB Almir, Fabrícus, Ana Hermínia, Helga, Davi, Jéssica Fenker, Leo Tedeschi, Tânia, Alisson, Heitor, Daniel Velho, Arthur, Arthur Sena, Glauber, Ana Cecília, Ângela, Carlos, Gabriel Druds, Gabriel Horta, Gabriel Caputo, Carol Azevedo, Guth, Isis, João Pantoja, Josué, Pietro, Jéssica dos Anjos, Roger, Tamara, Taíssa, Verônica, Marcella Santos, Renan, Pedro baiano, Pedro Podestá, Mariana Mira e Fernanda Werneck pela amizade e apoio;

Ao Daniel Velho, Davi, Isis, Arthur Sena, Guarino e Almir por terem me concedido as fotos que usei na filogenia;

Às colegas que ajudaram no campo Tamara, Luciana Pereira e Mariana Stein;

À Catia Dejuste por me iniciar nos caminhos dos quitrídios;

Ao Felipe Toledo, Carol Lambertini e Bia Carollo por terem me ensinado a técnica qPCR na UNICAMP;

Às minhas tias e tios Isabel e Zé Anchieta, Neusa e Sidnei, Sandra e Sérgio, Wercy e Caetano, Rosa e Juarez, meus primos Leandro, Adriano, Ciro, Marcus, Rildo, Túlio, Rildo e Jairzinho, Yago, Dyogo, Felipe, Tiago, Tiago Silva, primas Bia, Leila, Andrea e Naira, Patrícia, Ludmila, Vanessa, ao Cesar e à Ivanece, Juliana e Saulo, Camila e Igor, Carmem e Deja, Sara e Josa, tio Luizito e tia Carmita, Múcio e Rita, Rita e Arisvaldo, Ana Cristina, Ivânia e aos pequeninhos (as) filhos (as) das minhas primas e primos pelo imenso carinho, apoio e amor;

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de doutorado;

À Fundação O Boticário de Proteção à Natureza pelo auxílio financeiro ao projeto.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
CAPÍTULO 1	8
CAPÍTULO 2	14
RESUMO.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
TABELAS, LEGENDAS DAS FIGURAS E FIGURAS	48

RESUMO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Quitridiomicose é uma doença infecciosa emergente causada pelo fungo quitrídeo *Batrachochytrium dendrobatidis* e é responsável por declínios em populações de anfíbios em diversos lugares do mundo. O presente trabalho reporta o primeiro registro do fungo *B. dendrobatidis* em anfíbios de vida livre do Cerrado do Brasil Central e investiga a influência das características ecológicas das espécies e suas relações de parentesco nos parâmetros de infecção, em uma comunidade de anuros do Cerrado. Uma hipótese filogenética foi usada para testar a presença de sinal filogenético nesses parâmetros. Não foi detectada influência das distâncias filogenéticas sobre os parâmetros de infecção. Por outro lado, o tamanho e o peso corporal, o local de desova, o tipo de ninho, o modo reprodutivo e o índice aquático foram importantes preditores na prevalência e intensidade da quitridiomicose. A proximidade com a água parece ser um ponto chave na susceptibilidade dos anfíbios à infecção e as altas temperaturas do Cerrado e o período de baixa precipitação podem atuar como fatores limitantes ao desenvolvimento do fungo.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

ABSTRACT

Chytridiomycosis is an emergent infectious disease caused by the chyrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and is responsible for worldwide declines of amphibian populations. The current work reports the first record of *B. dendrobatidis* in free-living amphibians from Brazilian Cerrado and investigates the role of species traits and their phylogenetic relationships on infection parameters, in an anuran community in the Cerrado. An ensemble phylogenetic hypothesis was used to test for phylogenetic signal in these parameters. We found no influence of phylogenetic distances upon infection parameters. Conversely, body size and weight, spawning site, type of nest, reproductive mode and the aquatic index were important predictors of the prevalence and intensity of chytridiomycosis. The association with water seems to be a key point in the susceptibility of amphibians to infection and the high temperatures of the Cerrado and the period of low rainfall can act as limiting factors to the development of the fungus.

1
2

INTRODUÇÃO GERAL

3 O Brasil é o país com a maior diversidade de anfíbios do mundo [1]. Segundo
4 a Sociedade Brasileira de Herpetologia [2], no Brasil existem 1026 espécies de
5 anfíbios, sendo 988 anuros, e muitas são endêmicas [3]. De acordo com a "Lista
6 Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção" [4], 40 espécies de
7 anfíbios brasileiros encontram-se em alguma categoria de ameaça. Os três
8 principais fatores relacionados à ameaça dos anfíbios são a perda de habitat,
9 contaminantes ambientais e doenças infecciosas [3].

10 As doenças infecciosas mais comuns dos anfíbios possuem etiologia
11 bacteriana, viral, fúngica e parasitária. Dentre as de etiologia bacteriana estão a
12 dermatosepticemia bacteriana ("red leg syndrome"), flavobacteriose, micobacteriose
13 e clamidiose. A doença viral mais comum é a ranavirose. Dentre as doenças
14 fúngicas, as principais são a quitridiomicrose, zigomicose, cromomicose,
15 saprolegniose e ictiofoníase [5]. Dentre as doenças infecciosas, a quitridiomicrose é
16 a de maior importância para os anfíbios, pois causa grande impacto e juntamente
17 com a ranavirose está na lista das doenças mais relevantes de animais silvestres de
18 acordo com a OIE - Office International Des Epizooties [6].

19 A quitridiomicrose é uma doença infecciosa emergente, que ameaça a
20 população mundial de anfíbios e é causada pelo fungo *Batrachochytrium*
21 *dendrobatidis* (*Bd*) [7]. Por causar mortalidade em massa, acentuado declínio
22 populacional e a extinção de diversas espécies de anfíbios no mundo, alguns
23 sugerem que a quitridiomicrose é responsável pela maior perda de biodiversidade de
24 vertebrados já detectada [8-10]. Atualmente, mais de 516 espécies de anfíbios
25 foram infectadas pelo fungo [8-11]. Mesmo onde *Bd* é considerada endêmica, as
26 taxas de mortalidade continuam altas e as espécies que persistiram depois de

1 surtos de quitridiomycose continuam sofrendo declínios populacionais e redução da
2 distribuição geográfica [12-14].

3 Os primeiros casos de quitridiomycose foram detectados na América Central
4 (Panamá) e Austrália (Queensland) durante monitoramentos de fauna no mesmo
5 período, quando foi registrada mortalidade em massa em diversas espécies de
6 anfíbios, aparentemente não associada a distúrbios ambientais. Foi sugerido que
7 um patógeno altamente virulento e de alta transmissibilidade seria o agente
8 causador [15,16] e, em 1998, foi confirmado que o patógeno era um fungo [17]. Este
9 foi descrito como um novo gênero, *Batrachochytrium*, Filo Chytridiomycota, Classe
10 Chytridiomycetes, Ordem Chytridiales [7]. O desenvolvimento do talo, a ultra-
11 estrutura do zoósporo, a utilização dos anfíbios como hospedeiro e a sequência ssu-
12 rDNA de *Bd* diferem significativamente dos outros gêneros do grupo e até 2013 era
13 o único quitridiomyceto capaz de causar enfermidade em vertebrados [7,17-19]. Em
14 2013 uma nova espécie de *Batrachochytrium* foi descrita, *B. salamandrivorans*,
15 isolada de uma população de *Salamandra salamandra* que sofreu forte declínio
16 populacional em Bunderbos, nos Países Baixos, Europa ocidental [19].

17 Aparentemente, *Bd* acomete apenas anfíbios [7,17] e já foi registrada em
18 diversas espécies de anuros [11] e em algumas espécies de salamandras e cecílias
19 [20]. *Bd* também foi isolada da pele de lagartos e serpentes no Panamá [21] e em
20 patas de aves na Bélgica [22], onde esses animais possivelmente atuam como
21 vetores do fungo. *Bd* apresenta dois ciclos de vida, um na forma de zoosporângio
22 fixo ao substrato onde pode sobreviver por longos períodos [23] e outro de vida
23 livre, onde o zoósporo após um período de motilidade e dispersão encista-se na
24 pele de anfíbios [7,24]. Em estudos experimentais, os zoósporos encistaram na pele
25 de anfíbios expostos em menos de 12 h e produziram tubos germinativos que

1 penetraram nas células epiteliais do hospedeiro [25]. São formados então
2 zoosporângios, cujo conteúdo, chamado esporângio, sofre clivagem e produz novos
3 zoósporos por reprodução assexuada, que são liberados por uma ou mais papilas.
4 A duração desse ciclo de vida *in vitro* é de 4 a 5 dias a 22°C e provavelmente o
5 mesmo ocorra na pele dos anfíbios. O desenvolvimento do esporângio coincide com
6 o das células da epiderme e, à medida que estas se movem para a superfície e se
7 queratinizam, os esporângios as acompanham. Os tubos de descarga se projetam
8 até a superfície da pele e, assim, os zoósporos são liberados para o meio
9 [17,24,25].

10 Nos girinos, apenas a cavidade oral é susceptível à infecção, pois é o único
11 local onde há queratina [17], podendo gerar despigmentação e deformidades [26].
12 Durante a metamorfose, a pele torna-se mais queratinizada e, então, o fungo é
13 capaz de se disseminar pela superfície corporal [26-28]. Nos adultos, a infecção por
14 *Bd* é caracterizada pela formação de cistos nas células epiteliais dos dígitos, barriga
15 e face ventral das coxa, espessamento (hiperqueratose) e desprendimento da pele
16 [17]. A regulação osmótica fica comprometida e há uma queda no nível de eletrólitos
17 sanguíneos, causando um desequilíbrio hidroeletrólítico que leva os animais a óbito
18 por parada cardíaca [29]. Também já foi detectada a produção de fatores de inibição
19 de imunidade pelo fungo, que inibem a produção de linfócitos e resultam na
20 apoptose das células [30,31].

21 *Bd* já foi detectada em todos os continentes, com exceção da Antártica [11],
22 mas a origem da quitridiomicose ainda não foi completamente esclarecida. A
23 hipótese do patógeno endêmico sustenta que os declínios populacionais e extinções
24 em massa estão associados às mudanças climáticas, que tornam o patógeno mais
25 virulento e os animais mais susceptíveis [32-34]. Por outro lado, a hipótese do

1 patógeno invasor considera a quitridiomycose uma doença infecciosa emergente,
2 que foi introduzida em diferentes momentos em diversos locais do mundo [35]. O
3 sequenciamento genético de diferentes cepas sugere que *Bd* é endêmica em
4 algumas localidades, mas invasora em outras. São reconhecidas duas linhagens do
5 fungo, a linhagem pandêmica global (*Bd*-GPL) e a linhagem brasileira (*Bd*-Brazil)
6 [36], sendo que a última é aparentemente a mais antiga. Foram detectados híbridos
7 na Floresta Atlântica brasileira, possivelmente originários do cruzamento entre *Bd*-
8 GPL e *Bd*-Brazil, evidenciando reprodução sexuada no fungo [37]. O exame de
9 animais fixados em coleções biológicas revelou que *Bd* ocorre como uma enzootia
10 na Floresta Atlântica há pelo menos 116 anos (desde 1894), sem que tenha havido
11 qualquer surto durante esse período [38].

12 Pouco se sabe da patogenicidade de *Bd* nos anuros brasileiros, pois existem
13 poucos dados de longo prazo da dinâmica populacional desses animais para
14 identificar a ocorrência de declínios [39]. Em 2004 foi feito o primeiro registro de *Bd*
15 no Brasil, em *Hylodes magalhaese* (Leptodactylidae) proveniente de Camanducaia,
16 Minas Gerais [40,41]. Em seguida, *Bd* foi registrada em cinco espécies da Floresta
17 Atlântica: *Colostethus olfersioides* (Nova Iguaçu, Rio de Janeiro), *Thoropa miliaris*
18 (Peruíbe, São Paulo), *Hypsiboas freicanecae* (Jaqueira, Pernambuco),
19 *Crossodactylus caramaschii* (Apiaí, São Paulo) e *Bokermannohyla gouveai*
20 (Itamonte, Minas Gerais) [42]. Na mesma época, um estudo retrospectivo utilizando
21 girinos anuros com deformidades bucais identificou mais 16 espécies da Floresta
22 Atlântica infectadas com *Bd* [39]. Nos anos seguintes, diversos outros casos em
23 anfíbios da Mata Atlântica foram documentados [36,38,43-45].

24 Cerca de 204 espécies de anuros ocorrem no Cerrado brasileiro, sendo que
25 50% são endêmicas [46]. Baseados em dados de literatura, coleções e observações

1 de campo, Eterovick et al. [47] registraram o primeiro declínio populacional de
2 anfíbios nesse bioma, em *Epipedobates flavopictus* e *Crossodactylus bokermanni*,
3 embora a causa não tenha sido esclarecida. A ocorrência da quitridiomicose nos
4 anuros do Cerrado foi prevista através de modelos da distribuição de espécies [48].

5 O primeiro capítulo desse trabalho é um artigo científico publicado em 2013
6 relatando o primeiro registro de *Bd* no Cerrado em animais silvestres. O segundo
7 capítulo examina a associação entre parâmetros filogenéticos e ecológicos em uma
8 comunidade de anuros no Brasil Central, assim como as taxas de prevalência e
9 intensidade de infecção encontradas nesses animais.

10

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Capítulo 1

First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two endemic Cerrado hylids, *Bokermannohyla pseudopseudis* and *Bokermannohyla sapiranga*, with comments on chytridiomycosis spreading in Brazil

Ana Carolina de Oliveira Ramalho, Catia Dejuste de Paula, José Luiz Catão-Dias, Barbara Vilarinho, Reuber Albuquerque Brandão

2013. North-Western Journal of Zoology 9 (1): 145-150
Article No.: 131504

Abstract

We present the first record of Chytridiomycosis in Brazilian Cerrado, affecting two species belonging to the *Bokermannohyla pseudopseudis* species group. The present record extends the *Batrachochytrium dendrobatidis* occurrence more than 750 km north from the nearest known locality, showing that the fungus is widespread in Brazil. Since 2005, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has been recorded for 48 Brazilian anuran species in the wild, affecting 72 native populations in 24 localities. The records of new infected species and populations showed an accelerated increase, and several records are expected for future years.

Key words

Batrachochytrium dendrobatidis, *Bokermannohyla pseudopseudis*, *Bokermannohyla sapiranga*, Brazilian Cerrado, Chytridiomycosis.

**First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two endemic
Cerrado hylids, *Bokermannohyla pseudopseudis*
and *Bokermannohyla sapiranga*, with comments
on chytridiomycosis spreading in Brazil**

Ana Carolina de Oliveira RAMALHO^{1*}, Catia Dejuste DE PAULA²,
José Luiz CATÃO-DIAS³, Barbara VILARINHO⁴ and Reuber Albuquerque BRANDÃO⁴

1. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília,

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF, CEP 70910-900, Brazil.

2. Wildlife Conservation Society Brazil, Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

3. Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Pina, 87,
Cidade Universitária São Paulo - SP; CEP 05508-270, Brazil.

4. Laboratório de Fauna e Unidades de Conservação, Departamento de Engenharia Florestal,
Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF, CEP 70910-900, Brazil.

* Corresponding author, R. Brandão, E-mail: reuberbrandao@yahoo.com.br

Received: 28. July 2012 / Accepted: 04. January 2013 / Available online: 11. February 2013 / Printed: June 2013

Abstract. We present the first record of Chytridiomycosis in Brazilian Cerrado, affecting two species belonging to the *Bokermannohyla pseudopseudis* species group. The present record extends the *Batrachochytrium dendrobatidis* occurrence more than 750 km north from the nearest known locality, showing that the fungus is widespread in Brazil. Since 2005, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has been recorded for 48 Brazilian anuran species in the wild, affecting 72 native populations in 24 localities. The records of new infected species and populations showed an accelerated increase, and several records are expected for future years.

Key words: *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Bokermannohyla pseudopseudis*, *Bokermannohyla sapiranga*, Brazilian Cerrado, Chytridiomycosis.

Introduction

Amphibians are considered the most endangered vertebrates in the world (Stuart et al. 2004), and about 39% of all New World amphibians are threatened by extinction (Young 2004). Brazil harbors the largest global amphibian diversity, with more than 900 recorded species (Segalla et al. 2012), of which at least 208 have already been registered in the Brazilian Cerrado (Valdujo et al. 2012). The Brazilian Cerrado is the most diverse and endangered savanna in the world (Klink & Machado 2005, Myers et al. 2000), and presents an amphibian endemism rate of about 50% (Valdujo et al. 2012).

Infectious diseases are regarded as one of the most significant catalysts driving global amphibian declines (Young 2004). Among infectious diseases, the emerging chytridiomycosis is widely accepted to be a prominent cause of anuran population declines, and is considered by the Office International Des Epizooties to be a particularly threatening disease for wild animals (Schloegel et al. 2010a). Some records of anuran declines in the Brazilian Cerrado have been linked to habitat destruction (Brandão & Araujo 2008), but until now

no infectious diseases were considered a threat for anurans in the biome.

Chytridiomycosis is caused by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which has been detected in more than 350 amphibian species (Skerratt et al. 2007, Lips et al. 2006, Stuart et al. 2004). This widespread emerging disease has evidently been linked to the extinction and accentuated population declines in at least 200 amphibian species since 1980 (Skerratt et al. 2007).

The fungus targets amphibian skin and colonizes keratinous structures such as tadpole oral discs (Berger et al. 1998), as evidenced by discoloration and loss of oral structures, as denticles (Rachowicz et al. 2004). Infections in tadpoles can affect their feeding, thus constraining growth, metamorphosis, and survival (Blaustein et al. 2005, Berger et al. 1998, Berger et al. 1999). During metamorphosis the skin becomes more keratinized, allowing the fungus to potentially spread to other parts of the body (Rachowicz et al. 2004, Berger et al. 2004, De Paula & Catão-Dias 2011). In adults, the infection induces skin hyperkeratosis and slough off (Berger et al. 1998). The hyperkeratosis alters proper osmotic regulation, causing some individuals to suffer from a hydroelectro-

lytic imbalance and subsequent death due to a heart attack (Voyles et al. 2009, Campbell et al. 2012).

In Brazil, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has been recorded in species belonging to ten anuran families from the Atlantic Rain Forest (Becker & Zamudio 2011, Carnaval et al. 2005, Carnaval et al. 2006, Grundler et al. 2012, De Paula 2011, De Paula & Catão-Dias 2011, De Paula et al. 2012, Ron 2005, Schloegel et al. 2010b, Toledo et al. 2006a, Toledo et al. 2006b).

Herein, we report the first occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two endemic Cerrado frog species and briefly comment on the spreading of *Bd* in Brazil.

Material and Methods

The fungus was detected via histological analyses in three tadpoles of *Bokermannohyla pseudopseudis* from Chapada dos Veadeiros National Park, Alto Paraiso de Goiás municipality (14°18'54"S, 48°83'48"W; 1220m a.s.l.), and in five tadpoles of *Bokermannohyla sapiranga* from Serra dos Pirineus State Park, Pirenópolis municipality (15°80'05"S, 47°64'13"W; 1250m a.s.l.), State of Goiás (Fig. 1).

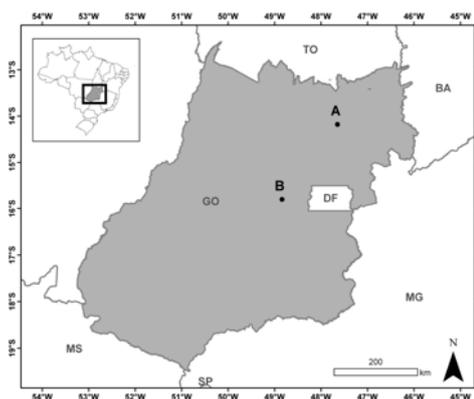


Figure 1. Map of the State of Goiás, Brazil, showing the localization of Chapada dos Veadeiros National Park (A) and Serra dos Pirineus State Park, Pirenópolis (B).

The climate of Chapada dos Veadeiros is Tropical highland (Cwa in Köppen climate classification), with monthly mean temperatures ranging from 21°C to 22°C, and 1550mm of annual rainfall. The climate of Pirenópolis municipality is classified as Tropical semi-humid (Aw in Köppen climate classification), with monthly mean temperatures ranging from 20°C to 23°C, and 1767 mm of annual rainfall.

We decided to check for chytrid infection in five *Bokermannohyla pseudopseudis* and seven *Bokermannohyla sapiranga* after we observed deformities in keratinized

oral structures. We fixed these frog tissues in formalin 10% and submitted them to histopathological examination. We then embedded 5µm sections of the oral discs in paraffin, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined with light microscopy.

Results

We observed various developmental stages of *Bd* infection within the keratinized epithelium of the oral discs (Fig. 2), including empty and septate zoosporangia.

We diagnosed *Bd* infection in five individuals of *Bokermannohyla sapiranga* and in three individuals of *B. pseudopseudis*, corresponding to a frequency of positive cases of 71% and 60%, respectively within the individuals sampled.

Our literature review (see Appendix I) showed that, since the first record in Brazil in 2005, *Bd* was recorded in more than 400 individuals belonging to 48 anuran species from the wild. Most of these records date back to 2006 (Toledo et al. 2006b, Carnaval et al. 2006), 2011 (De Paula 2011), and 2012 (Grunder et al. 2012). Differences in frequencies of positive cases vary both between different species and within the same species from different localities, disregarding detection method. The fungus was recorded for 22 widespread localities in the Atlantic Rain Forest biome, besides two localities in the Cerrado. The records in Cerrado are located more than 750km North from the nearest previous record (Rio Claro, SP), and suggest a wide *Bd* distribution range in Brazil. We guess that several new records of chytridiomycosis in Brazil, both affecting other species and new localities (Fig. 3) may be reported in future years.

Discussion

This is the first report of *Bd* in wild amphibians from the Cerrado biome and also for species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* species group (*B. pseudopseudis* and *B. sapiranga*). Both species occur in small geographic ranges at high altitudes (above 900m a.s.l.), and their tadpoles develop in low-temperature, fast-flowing streams and rivulets (Eterovick & Brandão 2001, Brandão et al. 2012). These features may increase their susceptibility to chytrid infection (Rödder et al. 2009). There are several reports of chytrid fungus causing infection of stream dwelling species (Piotrowski et al. 2004, Lips et al. 2003, La Marca et

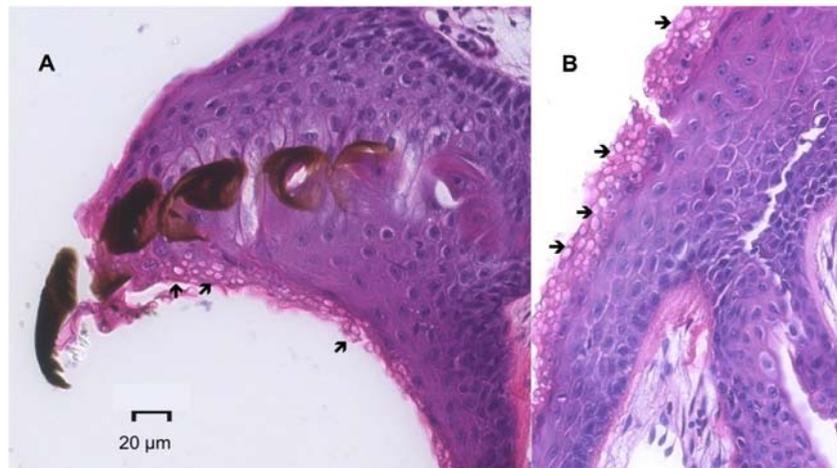


Figure 2. Photomicrograph of the oral disc of *Bokermannohyla sapiranga* (A) and of the oral disc of *Bokermannohyla pseudopseudis* (B). Note the presence of *Bd* zoospore sporangia (black arrows) in the keratin layer (H & E stained).

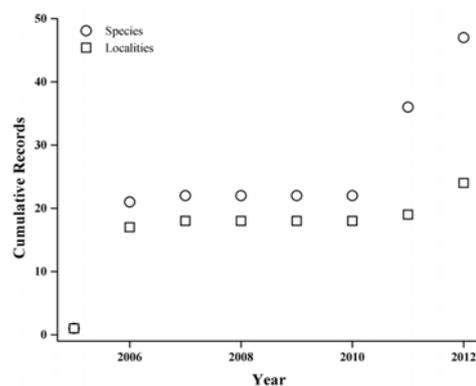


Figure 3. Relationship between cumulative infected frog species and cumulative localities by year in Brazil.

al. 2005). This report increases *Bd* occurrence in Brazil, extending its records to another Brazilian biome. Climate conditions in the Cerrado seem suitable for the survival and spread of the pathogen, and some models have already predicted the occurrence of *Bd* in the biome (Ron, 2005, Toledo et al. 2006b). More *Bd* studies are necessary for this biome and for the endemic *Bokermannohyla pseudopseudis* species, especially the effects of the putative prevalence on adults (Brannelly et al. 2012). Nonetheless, our report of chytrid presence may suggest new amphibian conservation concerns in the Brazilian Cerrado.

Acknowledgments. We are grateful to Barbara Rizzo, Nicolás Pelligrin, and an anonymous reviewer for several comments and language improvements, to Renata Françoso for the map, and to Allan Pessier for his help with the *Bd* diagnosis.

References

- Becker, C.G., Zamudio K.R. (2011): Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 9893.
- 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. (1998): Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-9036.
- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A. (1999): Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. pp. 23-31. In: *Declines and Disappearances of Australian Frogs*. Environment Australia, Australia.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H.B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C., Tyler, M.J. (2004): Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 82: 434-439.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Scheesele, E.A., Han, B.A., Pessier, A.P., Longcore, J.E. (2005): Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 19: 1460-1468.
- Brannelly, L.A., Chatfield, M.W.H., Richard-Zawacki, C.L. (2012): Field and laboratory studies of the susceptibility of the green treefrog (*Hyla cinerea*) to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection. *Plos One* 7: e38473.
- Brandão, R.A., Araújo, A.F.B. (2008): Changes in anuran species richness and abundance resulting from hydroelectric dam flooding in Central Brazil. *Biotropica* 40: 263-266.

- Brandão, R.A., Magalhães, R.F., Garda, A.A., Campos, L.A., Sebben, A., Maciel, N.M. (2012). A new species of *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae) from highlands of Central Brazil. *Zootaxa* 3527: 28-42.
- Campbell, C.R., Voyles, J., Cook, D.I., Dinudom, A. (2012). Frog skin epithelium: Electrolyte transport and chytridiomycosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 431-434.
- Carnaval, A.C.O.D., Toledo, L.F., Haddad, C.F.B., Britto, F. (2005). Chytrid fungus infects high-altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. *Froglog* 70: 3-4.
- Carnaval, A.C.O.D., Puschendorf, R., Peixoto, O.L., Verdade, V.K., Rodrigues, M.T. (2006). Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *Ecohealth* 3: 41-48.
- De Paula, C.D., Pacifico-Assis, E.C., Catão-Dias, J.L. (2012). *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians confiscated from illegal wildlife trade and used in ex-situ program in Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 171-175.
- De Paula, C.D. (2011). Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- De Paula, C.D., Catão-Dias, J.L. (2011). Chytridiomycosis: a devastating emerging fungal disease of amphibians. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 4: 250-258.
- Grundler, 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. (2012). Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 173-184.
- Eterovick, P.C., Brandão, R.A. (2001). The tadpoles and advertisement calls of species from the *Hyla pseudopseuadis* species group (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 35: 442-450.
- Klink, C.A., Machado, R.B. (2005). Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19: 707-713.
- La Marca, E., Lips, K.R., Lotters, S., Puschendorf, R., Ibanez, R., Rueda-Almonacid, J. V., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., Garcia-Perez, J.E., Bolanos, F., Chaves, G., Pounds, J.A., Toral, E., Young, B.E. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37: 190-201.
- Lips, K.R., Green, D.E., Papendick, R. (2003). Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37: 215-218.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P., Collins, J.P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3165-3170.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.
- Rachowicz, L.J., Vredenburg, V.T. (2004). Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms* 61: 75-83.
- Rödder, D., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidtlein, S., Bosch, J., Garner, T.W.J., Veith, M., Walker, S., Fisher, M.C., Lötters, S. (2009). Global amphibian risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity* 1: 52-66.
- Ron, S.R. (2005). Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37: 209-221.
- Schloegel, L.M., Daszak, P., Cunningham, A.A., Speare, R., Hill B. (2010a). Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 101-108.
- Schloegel, L.M., Ferreira, C.M., James, T.Y., Hipolito, M., Longcore, J.E., Hyatt, A.D., Yabsley, M., Martins, A.M.C.R.P.F., Mazzoni, R., Davies, A.J., Daszak, P. (2010b). The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation* 13: 53-61.
- Segalla, M.V., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Garcia, P.C.A., Grant, T., Haddad, C.F.B., Langone, J. (2012). Brazilian amphibians - List of species. <www.sberpetologia.org.br>, accessed at: 2012.07.05.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *Ecohealth* 4: 125-134.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783.
- Toledo, L.F., Haddad, C.F.B., Carnaval, A.C.O.D., Britto, F. (2006a). A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation* 4: 17-21.
- Toledo, L.F., Britto, F.B., Araújo, O.G.S., Giasson, L.M.O., Haddad, C.F.B. (2006b). The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology* 1: 185-191.
- Valdujo, P.H., Silvano, D.L., Colli, G.R., Martins, M. (2012). Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. *South American Journal of Herpetology* 7: 63-78.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W.F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt L.F. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* 326: 582.
- Young, B. E. (2004). Disappearing jewels: the status of New World amphibians. *NatureServe*.

Appendix I. Brazilian native amphibian populations infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Species	Locality (state)	Life stage	Screened individuals	Positive cases	Percentage of positive cases	Zoospore equivalents	Method	Reference
<i>Allobates olerisoides</i>	Nova Iguaçu (RJ)	adult	1	1	100%		histological	Carnaval et al. 2006
<i>Aplastodiscus arildae</i>	Boracéia (SP)	-	3	1	33%		PCR	De Paula 2011
<i>Aplastodiscus callipygius</i>	Monte Verde (MG)	-	12	9	75%	13141.54-38962.74	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	Camanducaia (MG)	-	2	1	50%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	8	3	38%	226.45-322.14	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	ESEC Boracéia (SP)	-	1	1	100%		PCR	De Paula 2011
<i>Aplastodiscus peraridis</i>	Monte Verde (MG)	-	13	12	92%	1127.08-2201.87	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Aplastodiscus</i> sp.	S. Luiz do Paraitinga (SP)	-	2	2	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Bokermannohyla astartea</i>	Boracéia (SP)	-	6	1	17%		PCR	De Paula 2011
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	15	9	60%	121.51-160.29	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	Petrópolis (RJ)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	Boracéia (SP)	-	2	1	50%		PCR	De Paula 2011
<i>Bokermannohyla gouaceni</i>	Itamonte (MG)	adult	1	1	100%		histological	Carnaval et al. 2006
<i>Bokermannohyla hylax</i>	Ilhabela (SP)	-	5	2	40%	25.42-23.78	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Bokermannohyla hylax</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	12	6	50%	72.40-120.80	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Bokermannohyla hylax</i>	S. Luiz do Paraitinga (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Bokermannohyla luctuosa</i>	Monte Verde (MG)	-	20	15	75%	5595.3 -10576.53	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Bokermannohyla pseudopsaudis</i>	Alto Paraíso (GO)	tadpole	5	3	60%	-	histological	Present study
<i>Bokermannohyla sapiranga</i>	Pirenópolis (GO)	tadpole	7	5	71%	-	histological	Present study
<i>Crossodactylus caramaschii</i>	Apiáí (SP)	adult	?	1	?	-	histological	Carnaval et al. 2006
<i>Cyclorhynchus boracéensis</i>	Ilhabela (SP)	-	17	3	18%	17.14-20.17	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Dendropsophus microps</i>	Boracéia (SP)	-	6	1	17%		PCR	De Paula 2011
<i>Dendropsophus microps</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	13	4	31%	71.18-109.06	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Dendropsophus microps</i>	Monte Verde (MG)	-	15	9	60%	577.31-1007.52	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Dendropsophus minutus</i>	Boracéia (SP)	-	6	1	17%		PCR	De Paula 2011
<i>Dendropsophus minutus</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	14	2	14%	24.91-27.67	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Dendropsophus minutus</i>	Floresta de Araucária (RS)	-	537				Real time PCR	Becker & Zamudio 2011
<i>Flectonotus olivasi</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	14	2	14%	58.60-80.50	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Haddadus binotatus</i>	Boracéia (SP)	-	2	1	50%		PCR	Paula 2011
<i>Haddadus binotatus</i>	Ilhabela (SP)	-	16	1	6%	41283	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hylodes asper</i>	Boracéia (SP)	-	7	2	29%		PCR	Paula 2011
<i>Hylodes asper</i>	Ilhabela (SP)	-	16	3	19%	20.91-14.55	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hylodes dactylocinus</i>	Peruibe (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hylodes magalhaesi</i>	Camanducaia (MG)	tadpole		4	100%		histological	Toledo et al. 2006a
<i>Hylodes magalhaesi</i>	Camanducaia (MG)	tadpole	2	2	100%		PCR	Toledo et al. 2006a
<i>Hylodes magalhaesi</i>	Camanducaia (MG)	tadpole	5	5	100%		PCR	Carnaval et al. 2006

Appendix I. (continued)

Species	Locality (state)	Life stage	Screened individuals	Positive cases	Percentage of positive cases	Zoospore equivalents	Method	Reference
<i>Hylodes magalhães</i>	Monte Verde (MG)	-	6	3	50%	2.55-1.41	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hylodes meridionalis</i>	Lauro Muller (SC)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hylodes meridionalis</i>	S. Francisco de Paula (RS)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hylodes perpicatus</i>	São Bento do Sul (SC)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hylodes phyllodes</i>	Boracéia (SP)	-	3	1	33%		PCR	De Paula 2011
<i>Hylodes phyllodes</i>	S. Luiz do Paratinga (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hylodes phyllodes</i>	Ilhabela (SP)	-	19	4	21%	192.38-368.85	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hylodes phyllodes</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	10	2	20%	112.67-155.64	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hylodes</i> sp.	S. Luiz do Paratinga (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hypsibios albonigritatus</i>	Boracéia (SP)	-	1	1	100%		PCR	De Paula 2011
<i>Hypsibios albopunctatus</i>	Rio Claro (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Hypsibios bischoffi</i>	Boracéia (SP)	-	9	1	11%		PCR	De Paula 2011
<i>Hypsibios faber</i>	Boracéia (SP)	-	3	2	67%		PCR	De Paula 2011
<i>Hypsibios faber</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	15	2	13%	40.56-37.22	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hypsibios freicancae</i>	Jaqueira (PE)	tadpole	2	2	100%		histological	Carnaval et al. 2006
<i>Hypsibios latistriatus</i>	Monte Verde (MG)	-	20	11	55%	302.41-449.21	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hypsibios parvialis</i>	Boracéia (SP)	-	3	1	33%		PCR	De Paula 2011
<i>Hypsibios parvialis</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	9	7	78%	359.67- 662.42	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hypsibios prasinus</i>	Monte Verde (MG)	-	15	10	67%	3539.00-3731.17	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Hypsibios semitinctus</i>	Boracéia (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Ischnocnema guentheri</i>	Santa Virgínia (RJ)	-	11	9	82%	2951.61+5969.84	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Ischnocnema parva</i>	Boracéia (SP)	-	3	2	67%		PCR	De Paula 2011
<i>Ischnocnema randorum</i>	Boracéia (SP)	-	1	1	100%		PCR	De Paula 2011
<i>Leptodactylus marmoratus</i>	Ilhabela (SP)	-	19	1	5%	12.13	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Megalosia massarti</i>	Santo André (SP)	-	2	2	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Megalosia</i> sp.	Caçapava (SP)	-	2	2	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Melanophryniscus moreirae</i>	Itatiaia (RJ)	adult	50	2	4%	1.4-1.5	Real time PCR	Van Sluys et al. 2007
<i>Phrynomedusa</i> sp.	São Luiz do Paratinga (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Physalaemus curieri</i>	São Paulo (SP)	adult	1	1	100%		histological	De Paula & Catão-Dias 2011
<i>Scinax albicans</i>	Petrópolis (RJ)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Scinax alter</i>	Boracéia (SP)	-	6	2	33%		PCR	De Paula 2011
<i>Scinax hayii</i>	Ilhabela (SP)	-	18	1	6%	108.48	Real time PCR	Grundler et al. 2012
<i>Thoropa miliaris</i>	ESEC Juréia, Peruibe (SP)	adult	1	1	100%		histological	Carnaval et al. 2006
<i>Thoropa taophora</i>	Ubatuba (SP)	-	1	1	100%		histological	Toledo et al. 2006b
<i>Thoropa taophora</i>	Ilhabela (SP)	-	24	6	25%	225.48- 258.32	Real time PCR	Grundler et al. 2012

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

INTRODUÇÃO

Embora a infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd* daqui por diante) seja letal para numerosas espécies, existe uma variação substancial na susceptibilidade dos hospedeiros [49,50]. Algumas espécies de anfíbios são mais susceptíveis [51-53] e podem sofrer extinções locais logo após a infecção pelo fungo [8,54-58], enquanto que outras persistem [59,60]. Algumas características ecológicas parecem influenciar a susceptibilidade à infecção [61]. Espécies aparentadas compartilham aspectos históricos e evolutivos e a susceptibilidade à infecção por *Bd* pode estar entre esses aspectos. [11,62].

A infecção se dá principalmente através da água contaminada [26], contato com a superfície da pele de animais infectados [63] ou ainda contato com substratos úmidos contaminados [8]. As diferentes oportunidades de espécies susceptíveis entrarem em contato com o patógeno ao longo da ontogenia podem explicar a dinâmica da infecção [64,65]. Espécies de reprodução prolongada ou com múltiplos eventos reprodutivos por ano podem ter maior oportunidade de contrair a infecção, pelo maior contato com a água e com um número maior de indivíduos, seja através do amplexo ou em disputas intrassexuais por territórios [66]. O tamanho do corpo também pode determinar o grau de exposição ao patógeno, já que espécies maiores possuem maior superfície corporal queratinizada [50,66,67].

Posto que a fase infectante de *Bd* é o zoósporo aquático, espécies associadas à água são aparentemente mais susceptíveis à infecção [68-73]. Por outro lado, espécies mais terrestres devem ser menos susceptíveis a declínios populacionais [74] e à quitridiomiose [11]. O comportamento reprodutivo também

1 pode afetar a susceptibilidade, pois espécies que depositam seus ovos na água
2 devem ter maiores chances de contrair a quitridiomiose [66,75,76].

3 Os fatores históricos são importantes para o entendimento dos mecanismos
4 de evolução das espécies. À partir de uma hipótese filogenética é possível estimar
5 se determinadas características associadas a diferentes espécies foram moldadas
6 por forças evolutivas, como por exemplo características herdadas à partir de um
7 ancestral comum. Nesse caso, espécies mais proximamente relacionadas são mais
8 similares e o comprimento dos ramos pode ser utilizado para estimar as relações
9 filogenéticas na análise de características comuns entre as espécies [77].
10 [78-80].

11 Diferentes adaptações morfológicas, ecológicas, biológicas e
12 comportamentais dos anuros, resultantes de suas interações com o meio ao longo
13 do processo evolutivo, permitem que eles ocupem diferentes tipos de ambientes
14 [81,82] e, em última análise, devem determinar sua susceptibilidade à infecção por
15 *Bd*. No presente estudo, foi determinada a influência da ecologia das espécies e
16 suas relações de parentesco sobre a prevalência e intensidade da quitridiomiose
17 em uma comunidade de anuros no Cerrado do Brasil Central. É esperado que
18 características compartilhadas que ampliem o contato dos indivíduos com *Bd* devem
19 influenciar sua susceptibilidade.

20

21

MATERIAL E MÉTODOS

22 Coleta das Amostras

23 O estudo foi realizado ao longo da Lagoa Bonita, na Estação Ecológica de
24 Águas Emendadas (ESECAE), Planaltina, Distrito Federal (15°32' a 15°38' S e
25 47°33' a 47°37' W) (Fig. 1), onde a altitude varia entre 1.000 e 1.150 m. As coletas

1 foram realizadas uma vez por semana, em todos os meses de 2013. Os animais
2 foram localizados à noite, ao longo de transeções percorridas a pé, para evitar a
3 coleta do mesmo indivíduo numa mesma noite, e capturados com as mãos
4 paramentadas com luvas. Para cada animal foi utilizado um par de luvas, para evitar
5 falsos positivos por contaminação cruzada entre as amostras. Foi esfregado um
6 cotonete na parte ventral da região inguinal, coxas e pés dos animais. Os cotonetes
7 foram acondicionados em tubos "ependorf" e mantidos congelados a -20° C. Os
8 animais foram liberados imediatamente após a coleta de material.

9 As amostras foram analisadas para detecção do fungo por "quantitative
10 polymerase chain reaction" – qPCR [83,84]. A extração de DNA dos cotonetes foi
11 feita com a adição de 100µl de PrepMan Ultra. Os tubos foram centrifugados duas
12 vezes, fervidos por 10 min, resfriados à temperatura ambiente e centrifugados
13 novamente. Depois, foram transferidos 45µl da solução para novos tubos, que foram
14 armazenados em freezer a -20°.

15

16 **Detecção do Fungo**

17 Depois que a solução de 45µl foi descongelada e centrifugada, foi feita uma
18 diluição 1:10 com 8 µl desta solução e 32 µl de H₂O MilliQ. Então, em cada poço da
19 placa de qPCR foi adicionado 20 µl do Master Mix da reação contendo 1.300 µl de
20 TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), 286 µl de água livre de nucleases, 130 µl
21 do primer ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') a 18 µM,
22 130 µl do primer 5.8S Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3') a 18 µM, 130
23 µl da sonda ChytrMGB2 (5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3') a 5 µM e
24 104 µl de BSA a 40ng/µl. Dos 96 poços da placa de qPCR, 80 foram preenchidos
25 com 5 µl do DNA extraído diluído 1:10, dois foram preenchidos com 5 µl de água

1 livre de nucleases (controles negativos), e os outros 14 poços foram preenchidos
2 com os padrões nas diluições 10^3 , 10^2 , 10, 1 e 10^{-1} g.e. (genoma equivalente) para
3 a construção da curva padrão.

4 A partir da qPCR, foram determinadas a prevalência e a intensidade da
5 infecção. A prevalência representa o número de indivíduos infectados de uma
6 determinada espécie em relação ao número total de indivíduos amostrados daquela
7 espécie. A intensidade da infecção é o número de zoósporo/equivalentes
8 encontrados em cada indivíduo. Os indivíduos foram considerados infectados
9 quando o número de zoósporo-equivalentes foi ≥ 1 .

10

11 **Dados Ecológicos**

12 Os dados ecológicos utilizados nas análises foram: massa (g), comprimento
13 rostro-uróstilo (mm), índice aquático, reprodução (adaptado a partir de Kopp et al.,
14 [85], as espécies com duração do período reprodutivo igual ou maior que quatro
15 meses foram consideradas de reprodução prolongada e menor que quatro meses
16 foram consideradas de reprodução explosiva), sítio de desova (folhagem, chão,
17 água), tipo de ninho (água, espuma na água, espuma no chão ou folhagem) e modo
18 reprodutivo segundo Haddad & Prado, [86], onde a estimativa aumenta de acordo
19 com a independência da água para a reprodução (Tabela 1).

20 O índice aquático (IA) foi proposto por Lips et al., [73] em um estudo sobre fatores
21 ecológicos preditores de declínios populacionais em anfíbios no Panamá, segundo
22 esse trabalho os animais foram classificados como exclusivamente terrestres (IA=
23 1), animais que vivem em poças ou múltiplos habitats (IA= 2) e espécies
24 exclusivamente ripárias (IA= 3), como resultado o índice aquático foi o dado
25 ecológico mais importante para prever possíveis declínios populacionais. Em 2014,

1 Becker et al.[72] utilizou o índice aquático como uma das características ecológicas
2 para testar o efeito da diversidade filogenética e de características ecológicas das
3 espécies de anfíbios na dinâmica de infecção da quitridiomicose, nesse contexto os
4 pesquisadores adaptaram o índice aquático proposto por Lips et al.,[73] de modo
5 que representasse a soma da quantidade de tempo empregado em ambientes
6 aquáticos, da seguinte maneira: espécies exclusivamente terrestres (i.e.
7 desenvolvimento direto) (IA= 0), espécies que se reproduzem em ambiente
8 aquático, mas ocupam o extrato arbóreo (IA= 1), espécies que se reproduzem em
9 ambiente aquático e ocupam margens de rios e outros corpos d'água (IA= 2). No
10 presente trabalho atribuímos índices aquáticos para as espécies de acordo com
11 Becker et al.,[72].[73]

12

13 **Análises Estatísticas**

14 Para investigar diferenças entre espécies na prevalência da infecção, foram
15 realizados dois testes de independência utilizando permutações, um com a soma
16 dos quadrados dos resíduos de χ^2 de Pearson e outro com o valor máximo absoluto
17 dos resíduos de χ^2 de Pearson, com o pacote vcd [87]. A intensidade de infecção
18 para cada espécie foi calculada como a média dos indivíduos amostrados. Para
19 avaliar a relação entre a prevalência e as características ecológicas, foram feitas
20 análises de modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição binomial dos
21 resíduos e função de ligação logit. Para avaliar a relação entre a intensidade de
22 infecção e as características ecológicas, foram feitas análises de GLMs com
23 distribuição de Poisson dos resíduos e função de ligação logarítmica. Nos casos em
24 que houve sobredispersão dos dados, foi empregada a distribuição quasi-Poisson
25 [88] com o pacote MASS [89]. Em relação à distribuição quasi-Poisson, a

1 distribuição binomial negativa dá maior importância relativa aos valores menores,
2 fazendo com que tenham um maior efeito no ajustamento da regressão [90]. Como
3 o objetivo da análise é estimar a relação dos maiores valores, ou seja, dos
4 indivíduos infectados, é mais adequado um ajustamento dominado por esse efeito,
5 que ocorre na regressão quasi-Poisson [90] e por isso ela foi escolhida para
6 determinar a significância dos GLMs. Como não é possível obter valores de AIC_c de
7 GLMs com distribuição quasi-Poisson dos resíduos, a seleção de modelos nesses
8 casos foi feita com a distribuição binomial negativa [88].

9 A significância dos GLMs foi determinada por comparação com um modelo
10 nulo, contendo apenas a interseção, através do valor de χ^2 . Além disso, foi usada
11 uma abordagem da teoria de informação, onde todos os modelos possíveis foram
12 ordenados segundo o valor do critério de informação de Akaike corrigido para
13 pequenas amostras (AIC_c) e foram calculados os coeficientes médios, com o pacote
14 MuMIn [91]. Nesse caso, a importância dos preditores é definida como a soma dos
15 pesos de Akaike ($wAIC_c$) de todos os modelos contendo cada preditor [92].

16 A partir de Pyron e Wiens [93], foi estimada uma hipótese filogenética para as
17 espécies da comunidade (Fig. 2). Como *Elachistocleis cesarii* não está representada
18 na hipótese filogenética de Pyron e Wiens [93], ela foi substituída por *Elachistocleis*
19 *ovalis*. Outras seis espécies foram inseridas manualmente na topologia, com o
20 programa Mesquite [94]: *Rhinella rubescens* (como espécie irmã de *R. schneideri*),
21 *Physalaemus centralis* (*P. cuvieri*), *Scinax fuscomarginatus* (*S. fuscovarius*) e
22 *Dendropsophus jimi* (*D. rubicundulus*). Em cada um desses casos, o comprimento
23 de ramo original [93] foi dividido igualmente entre as espécies-irmãs.
24 *Pseudopaludicola ternetzi* foi também inserida manualmente na base do ramo das
25 espécies de *Physalaemus* [95] e *Phyllomedusa azurea* na base de Hylidae [96].

1 Nesses dois últimos casos, o comprimento dos ramos foi considerado idêntico ao do
2 ramo mais longo no clado-irmão. Nós assumimos que o impacto da substituição de
3 um táxon terminal por outro proximoamente aparentado deve ser irrelevante para os
4 resultados, uma vez que a maior parte das mudanças evolutivas na filogenia dos
5 anfíbios ocorre em nós mais profundos [93].

6 A partir dessa filogenia, foram aplicados métodos comparativos que levam
7 em conta a falta de independência entre as espécies [97,98]. Para realizar uma
8 partição da variação na prevalência e intensidade da infecção por *Bd* entre a
9 filogenia e o ambiente [99], foi utilizada uma regressão por autovetores filogenéticos
10 (PVR), com o pacote PVR [100]. Esse método estima o sinal filogenético extraindo
11 autovetores, através da análise de coordenadas principais (PCoA), a partir de uma
12 matriz de distâncias que descreve a relação filogenética entre as espécies [101].
13 Foram feitos testes de sinal filogenético na intensidade e prevalência de infecção,
14 através das estatísticas K de Blomberg e λ de Pagel, com o pacote phytools [102].
15 Esses testes demonstram se há independência filogenética ou se a intensidade e
16 prevalência estão distribuídas como esperado no caso de taxa de evolução
17 constante, segundo o movimento Browniano [103-105]. Todas as análises
18 estatísticas foram feitas no programa R [106] utilizando o nível de significância de
19 5% em testes de hipóteses.

20

21

22

RESULTADOS

23

24

25

Foram coletadas 318 amostras, de 16 espécies, nove gêneros e cinco famílias de anuros (Tabela 1). Dentre as amostras, 46 foram positivas para *Bd* (14,47%), sendo esse o primeiro registro do fungo na Estação Ecológica de Águas

1 Emendadas e no Distrito Federal. Seis espécies não apresentaram nenhum
2 indivíduo infectado: *Dendropsophus rubicundulus*, *Hypsiboas raniceps*,
3 *Leptodactylus latrans*, *Phyllomedusa azurea*, *Pseudopaludicola ternetzi* e *Rhinella*
4 *schneideri*. Porém, poucos indivíduos de *H. raniceps* ($n = 2$), *L. latrans* (2), *P. azurea*
5 (1) e *R. schneideri* (1) foram amostrados. *Physalaemus cuvieri* e *Scinax*
6 *fuscomarginatus* tiveram mais indivíduos infectados do que o esperado sob a
7 hipótese de independência (Fig. 3), tanto considerando o máximo absoluto dos
8 resíduos de Pearson ($r_P = 3,426$; $P = 0,005$), quanto a soma dos quadrados dos
9 resíduos de Pearson ($\chi^2 = 40,408$; $P < 0,001$).

10 O GLM relacionando a prevalência da infecção por *Bd* às características
11 ecológicas foi altamente significativo ($\chi^2_7 = 24,458$; $P < 0,001$). A análise de
12 modelos médios indicou que reprodução, índice aquático, massa e tamanho
13 corporal, modo reprodutivo e desova são os melhores preditores da prevalência da
14 infecção (Tabela 2). As espécies de reprodução prolongada, com menor índice
15 aquático, com maior massa, menor tamanho corporal, maior estimativa de modo
16 reprodutivo e que desovam no chão e em folhas tendem a apresentar menor
17 prevalência de infecção por *Bd*.

18 O GLM com distribuição de Poisson dos resíduos, relacionando a intensidade
19 da infecção por *Bd* às características ecológicas, evidenciou sobredispersão dos
20 dados, pelo que foi calculado outro GLM, mas com distribuição quasi-Poisson dos
21 resíduos. Esse modelo completo, contendo todas as características ecológicas, não
22 foi significativo ($\chi^2_7 = 4549,1$; $P = 0,4884$). A análise de modelos médios indicou que
23 a massa e tamanho corporal, o índice aquático, a reprodução e o local de desova
24 são os melhores preditores da intensidade da infecção (Tabela 3). As espécies com
25 maior massa corporal, menor índice aquático, reprodução prolongada, que desovam

1 no chão e em folhas, e com maior tamanho corporal tendem a apresentar menor
2 intensidade de infecção por *Bd*.

3 A análise de partição de variação na prevalência da infecção por *Bd* revelou
4 que 38% da variação são explicados pela ecologia das espécies, 15% pela
5 filogenia, 3% são compartilhados pela ecologia e filogenia, e 49% representam
6 variação residual. Quanto à intensidade da infecção por *Bd*, 35% da variação são
7 explicados pela ecologia das espécies, 16% pela filogenia, 0% são compartilhados
8 pela ecologia e filogenia, e 55% representam variação residual. Não houve sinal
9 filogenético significativo na prevalência ($\lambda = 0,0006$, $P = 1$; $K = 0,35$, $P = 0,52$) ou
10 intensidade ($\lambda = 0,58$, $P = 0,20$; $K = 0,64$, $P = 0,16$) de infecção por *Bd*.

11

12

DISCUSSÃO

13 O entendimento dos padrões da dinâmica patógeno-hospedeiro é
14 fundamental para atenuar os efeitos deletérios de doenças emergentes em espécies
15 potencialmente susceptíveis. Além disso, o conhecimento das características
16 específicas que as predispõem a um determinado patógeno pode auxiliar
17 diretamente nas estratégias de conservação [50]. Diferentes espécies de anfíbios
18 apresentam similaridades e diferenças em traços ecológicos como tamanho e peso
19 corporal, tipo de habitat preferencial e aspectos reprodutivos, resultantes de sua
20 interação com o meio e de suas relações de parentesco, que podem determinar o
21 grau de exposição à uma determinada enfermidade [62,64]. Logo, espécies que
22 coexistem em uma comunidade podem possuir diferentes graus de susceptibilidade
23 [61].

24 De acordo com os resultados encontrados, as relações filogenéticas não
25 explicaram a susceptibilidade à infecção. Apesar da ausência de trabalhos

1 buscando relacionar as distâncias filogenéticas aos parâmetros de infecção por
2 quitridiomicose, já foi relatada uma maior associação dos parâmetros de infecção da
3 quitridiomicose à determinados taxons, utilizando apenas a identificação das
4 espécies, como por exemplo para Ranidae [66], Alytidae e Bombinatoridae [62], no
5 entanto outros trabalhos que utilizaram essa abordagem não encontraram relação
6 [38,107]. Nunca foram relatadas evidências de coevolução entre espécies de
7 anfíbios e *Bd* [108], como pode ocorrer em espécies de fungos que acometem
8 humanos [109]. *Bd* tem sido amplamente reportada como um agente infeccioso
9 generalista e a grande quantidade de espécies acometidas pelo fungo suporta essa
10 evidência [110,111].

11 *Physalaemus cuvieri* e *Scinax fuscomarginatus* apresentaram as mais altas
12 prevalências de infecção da comunidade e mais da metade dos animais coletados
13 estavam infectados, sendo o número de indivíduos infectados maior que o esperado
14 ao acaso. As duas espécies são ecologicamente generalistas e não se limitam a um
15 determinado tipo de habitat ou a um determinado sitio de reprodução [112]. Além
16 disso, possuem ampla distribuição geográfica ocorrendo no Cerrado e na Mata
17 Atlântica [113]. Espécies generalistas tendem a ser menos susceptíveis a declínios
18 populacionais [74] e, geralmente, persistem na comunidade após surtos de
19 quitridiomicose [114]. Aparentemente, espécies generalistas possuem um sistema
20 imune mais adaptado para lidar com uma gama maior de patógenos, muitas vezes
21 funcionando como potenciais reservatórios e vetores do *Bd* [107]. Hospedeiros que
22 agem como reservatórios têm grande importância na epidemiologia da
23 quitridiomicose e podem atuar na dinâmica da infecção como amplificadores da
24 doença, por permitirem a persistência do fungo mesmo em comunidades onde o
25 número de espécies susceptíveis é baixo [115]. Em comunidades de anfíbios com

1 quitridiomycose, as espécies amplificadoras possuem as características encontradas
2 para *P. cuvieri* e *S. fuscomarginatus*, i.e., altas taxas de infecção e baixa
3 susceptibilidade, facilitando a infecção de outras espécies sintópicas [72,116].

4 Grande parte da infecção esteve associada às características ecológicas e
5 espécies mais relacionadas à água durante seus ciclos de vida apresentaram maior
6 intensidade e prevalência de infecção. A proximidade com ambientes aquáticos é
7 fator significativo para a predição de declínios e extinções de anfíbios [10,73] e
8 também para a susceptibilidade à infecção por *Bd* [38,61,65,107,117]. Da mesma
9 forma, o modo reprodutivo, o local de desova e o tipo de ninho associados à água
10 apresentaram maior intensidade e prevalência de infecção. Espécies que possuem
11 ninhos aquáticos têm contato com a água durante a deposição dos ovos e formação
12 do ninho. Algumas vezes a vocalização e o amplexo também ocorrem dentro da
13 água, aumentando assim o grau de exposição ao fungo [66]. É interessante notar
14 que, segundo a classificação dos modos reprodutivos, a presença de ovos e girinos
15 aquáticos em ambientes lênticos é a condição ancestral e mais comum entre os
16 anfíbios [71,86,118]. Tal qual a ação de predadores aquáticos [86], podemos
17 considerar que a quitridiomycose é um fator de risco para espécies mais associadas
18 à água.

19 O Cerrado é uma savana neotropical que sazonalmente experimenta
20 períodos de baixa umidade do ar e é provável que a forma infectante do fungo
21 sobreviva apenas na água e em locais próximos à ela. *Bd* possui limitações
22 fisiológicas relacionadas à dessecação; logo, é esperado que espécies que utilizam
23 a água somente no período larval sejam menos infectadas [13,119].

24 *Bd* tem preferência por temperaturas mais frias para sobrevivência e
25 reprodução (17°C a 25) [80] e a probabilidade de infecção por *Bd* nos anfíbios

1 diminui continuamente a partir da temperatura corporal de 25°C [120]. Sabe-se que
2 os anfíbios conseguem se livrar completamente da infecção permanecendo a 37°C
3 por 16 horas, essa capacidade pode estar associada tanto à temperatura ambiental,
4 como também a um aspecto comportamental de manipulação da temperatura [121].
5 Já foi observado inclusive a chamada "febre comportamental" em estudos
6 laboratoriais com anfíbios [122], onde os animais alteraram o comportamento
7 termorregulatório mantendo uma temperatura corporal acima da temperatura usual
8 mantida por animais não infectados [123]. Richards-Zawacki [124] demonstrou em
9 uma população de *Atelopus zeteki* um aumento significativo da temperatura corporal
10 após exposição ao fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. No entanto, as espécies
11 que utilizam a água em diversos ciclos de vida podem se reinfectar, mesmo que
12 tenham se livrado da infecção [120,124]. Embora, no Cerrado, a média diária de
13 temperatura se mantenha estável durante todo o ano, algumas espécies, como
14 *Bokermannohyla alvarengai*, possuem um comportamento de assoalhamento
15 podendo gerar um aumento na temperatura corporal por exposição prolongada ao
16 sol [120,124]

17 Espécies com maior massa corporal apresentaram menor intensidade e
18 prevalência de infecção e as espécies de maiores médias de CRU apresentaram
19 menor intensidade, porém maior prevalência de infecção. Em Queensland,
20 Austrália, foi verificada que espécies maiores possuem menor susceptibilidade a
21 declínios populacionais, no mesmo período em que o *Bd* foi descrito pela primeira
22 vez [74]. Existe também uma correlação positiva entre o tamanho das espécies e o
23 número de ovos por desova [71] e animais com maior fecundidade tendem a ser
24 menos susceptíveis a declínios populacionais [74]. Um outro fator interessante é
25 que espécies menores estão mais associadas a habitats florestados e fechados [86]

1 e espécies de áreas fechadas tem sido relatadas com maior intensidade de infecção
2 [120]. Talvez a própria espessura da pele de espécies maiores possa funcionar
3 como uma barreira à fixação do fungo, ou ainda, outros parâmetros ecológicos
4 podem estar influenciando na dinâmica de infecção, como por exemplo, espécies
5 maiores atingem temperaturas mais altas termorregulando [125], podendo assim se
6 livrar da infecção.

7 Espécies de reprodução prolongada apresentaram menor prevalência e
8 intensidade de infecção. Uma das hipóteses é que espécies com reprodução
9 prolongada apresentam maior intensidade e prevalência de infecção, uma vez que
10 ficam mais tempo expostas em contato com outros indivíduos contaminados e com
11 a água contaminada com zoósporos infectantes. É possível que, no Cerrado, as
12 espécies que ficam mais tempo expostas tenham mais oportunidades de se livrar da
13 infecção por termorregulação [126], o que poderia contrabalancear a maior
14 oportunidade de infecção.

15 Aparentemente não estão ocorrendo declínios populacionais na comunidade
16 estudada e a prevalência de infecção é relativamente baixa em comparação com as
17 encontradas na Mata Atlântica brasileira [39,43,45]. Mas isso não significa que um
18 declínio populacional ou extinções não possam ocorrer em decorrência da
19 coexistência com o fungo [126]. Estudos experimentais mostram que a intensidade
20 de infecção máxima que um indivíduo suporta é de 10.000 zoósporos (equivalente
21 genômicos, no caso do diagnóstico por qPCR) [127,128]. Na comunidade estudada,
22 um indivíduo de *Elachistocleis cesarii* (22.612,93 equivalentes genômicos) e um
23 outro de *Dendropsophus jimi* (49.817,16 equivalentes genômicos) ultrapassaram
24 esse limite.

1 A proximidade com a água parece ser um ponto chave da quitridiomycose nos
2 anfíbios do Cerrado, sugerindo que grande parte infecção seja adquirida pelo
3 contato com a água contaminada com os zoósporos. No Cerrado, a termorregulação
4 pode atuar como um fator de proteção para os anfíbios [121,124,129,130]. As altas
5 temperaturas que o Cerrado atinge em determinadas épocas e o longo período de
6 estiagem anual podem dificultar o crescimento e reprodução do patógeno [79].

7

8

Referências bibliográficas

- 9 1. Silvano DL, Segalla MV (2005) Conservação de anfíbios no Brasil.
10 Megadiversidade 1: 79-86.
- 11 2. Segalla MV, Caramaschi U, Cruz CAG, Grant T, Haddad CFB, et al. (2014)
12 Brazilian amphibians: List of species. Herpetologia Brasileira 3: 37-48.
- 13 3. Young BE, Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Boucher TM (2004) Disappearing
14 jewels: the status of New World amphibians. Arlington, EUA: NatureServe.
- 15 4. MMA (2014) Portaria MMA No 444, de 17 de dezembro de 2014. In: MMA, editor.
16 Diário Oficial da União. Brasil. pp. 121.
- 17 5. Densmore CL, Green DE (2007) Diseases of Amphibians. Institute for Laboratory
18 Animal Research 48: 235-254.
- 19 6. Schloegel LM, Daszak P, Cunningham AA, Speare R, Hill B (2010) Two
20 amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally
21 notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): An assessment.
22 Diseases of Aquatic Organisms 92: 101-108.
- 23 7. Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen.
24 et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91: 219-227.

- 1 8. Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD, Alford RA, et al. (2006) Emerging
2 infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian
3 community. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
4 States of America 103: 3165-3170.
- 5 9. Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, et al. (2007) Spread of
6 chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs.
7 EcoHealth 4: 125-134.
- 8 10. Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, et al. (2004) Status
9 and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306:
10 1783-1786.
- 11 11. Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, Powell CI, Walker SF, et al. (2013)
12 Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the
13 amphibian chytrid fungus. Plos One 8: e56802.
- 14 12. Lenker M, Savage AE, Becker CG, Rodriguez D, Zamudio KR (2013)
15 *Batrachochytrium dendrobatidis* infection dynamics vary seasonally in Upstate
16 New York. Diseases of Aquatic Organisms 111: 51-60.
- 17 13. Brem FMR, Lips KR (2008) *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns
18 among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during
19 epizootic and enzootic. Diseases of Aquatic Organisms 81: 189-202.
- 20 14. Crawford AJ, Lips KR, Bermingham E (2010) Epidemic disease decimates
21 amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the
22 highlands of central Panama. Proceedings of the National Academy of
23 Sciences of the United States of America 107: 13777-13782.
- 24 15. Lips KR (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. Conservation
25 Biology 12: 106-117.

- 1 16. Laurance WF, McDonald KR, Speare R (1996) Epidemic disease and the
2 catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology* 10:
3 406-413.
- 4 17. Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, et al. (1998)
5 Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population
6 declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of*
7 *the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-
8 9036.
- 9 18. James TY, Porter D, Leander CA, Vilgalys R, Longcore JE (2000) Molecular
10 phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data
11 in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany* 78: 336-350.
- 12 19. Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, et al. (2013)
13 *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in
14 amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 15325-
15 15329.
- 16 20. Gower DJ, Doherty-Bone T, Loader SP, Wilkinson M, Kouete MT, et al. (2013)
17 *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and lethal chytridiomycosis in
18 caecilian amphibians (Gymnophiona). *EcoHealth* 10: 173-183.
- 19 21. Kilburn VL, Ibáñez R, Green DM (2011) Reptiles as potential vectors and hosts
20 of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama.
21 *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 127-134.
- 22 22. Garmyn A, Van Rooij P, Pasmans F, Hellebuyck T, Van Den Broeck W, et al.
23 (2012) Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus
24 *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Plos One* 7: e35038.

- 1 23. Mitchell KM, Churcher TS, Garner TWJ, Fisher MC (2008) Persistence of the
2 emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian
3 host greatly increases the probability of host extinction. Proceedings of the
4 Royal Society B-Biological Sciences 275: 329-334.
- 5 24. Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE (2005) Life cycle stages of the
6 amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic
7 Organisms 68: 51-63.
- 8 25. Greenspan SE, Longcore JE, Calhoun AJK (2012) Host invasion by
9 *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model
10 anurans. Diseases of Aquatic Organisms 100: 201-210.
- 11 26. Rachowicz LJ, Vredenburg VT (2004) Transmission of *Batrachochytrium*
12 *dendrobatidis* within and between amphibian life stages. Diseases of Aquatic
13 Organisms 61: 75-83.
- 14 27. Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, et al. (2004) Effect of
15 season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis.
16 Australian Veterinary Journal 82: 434-439.
- 17 28. Paula CD (2011) Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios
18 anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo [Tese de
19 Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo. 139 p.
- 20 29. Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, et al. (2009)
21 Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian
22 declines. Science 326: 582-585.
- 23 30. Fites JS, Ramsey JP, Holden WM, Collier SP, Sutherland DM, et al. (2013) The
24 invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses.
25 Science 342: 366-369.

- 1 31. McMahon TA, Brannelly LA, Chatfield MWH, Johnson PTJ, Joseph MB, et al.
2 (2013) Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian
3 hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of
4 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 210-215.
- 5 32. Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, et al.
6 (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by
7 global warming. *Nature* 439: 161-167.
- 8 33. Bosch J, Carrascal LM, Duran L, Walker S, Fisher MC (2007) Climate change
9 and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central
10 Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*
11 274: 253-260.
- 12 34. Rachowicz LJ, Hero JM, Alford RA, Taylor JW, Morgan JAT, et al. (2005) The
13 novel and endemic pathogen hypotheses: Competing explanations for the
14 origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology* 19:
15 1441-1448.
- 16 35. Lips KR, Diffendorfer J, Mendelson JR, Sears MW (2008) Riding the wave:
17 Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines.
18 *Plos Biology* 6: 441-454.
- 19 36. Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, Greenspan SE, Vieira CA, et al. (2012)
20 Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis
21 associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology* 21: 5162-5177.
- 22 37. Rosenblum EB, James TY, Zamudio KR, Poorten TJ, Ilut D, et al. (2013)
23 Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome
24 resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:
25 9385-9390.

- 1 38. Rodriguez D, Becker CG, Pupin NC, Haddad CFB, Zamudio KR (2014)
2 Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing
3 fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology* 23: 774-787.
- 4 39. Toledo LF, Britto FB, Araújo OGS, Giasson LMO, Haddad CFB (2006) The
5 occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17
6 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology* 1: 185-191.
- 7 40. Carnaval A, Toledo L, Haddad C, Britto F (2005) Chytrid fungus infects high-
8 altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian
9 Atlantic rainforest. *Froglog* 70.
- 10 41. Toledo L, Haddad C, Carnaval A, Britto F (2006) A Brazilian anuran (*Hylodes*
11 *magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a
12 conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation* 4: 17-21.
- 13 42. Carnaval ACOD, Puschendorf R, Peixoto OL, Verdade VK, Rodrigues MT (2006)
14 Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain
15 Forest. *EcoHealth* 3: 41-48.
- 16 43. Lisboa BS, Neves JMM, Nascimento FAC, Tavares-Bastos L, Mott T (2013) New
17 records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Atlantic Forest of
18 northeastern Brazil. *North-Western Journal of Zoology* 9: 210-213.
- 19 44. Vieira CA, Henrique C, Almeida LN, Lambertini C, Leite DS, et al. (2012) First
20 record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Paraná, Brazil. *Herpetological*
21 *Review* 43: 93-94.
- 22 45. Vieira CA, Toledo LF, Longcore JE, Longcore JR (2013) Body length of *Hylodes*
23 cf. *ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of
24 mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related.
25 *Brazilian Journal of Biology* 73: 195-199.

- 1 46. Valdujo PH (2011) Diversidade e distribuição de anfíbios no Cerrado: o papel
2 dos fatores históricos e dos gradientes ambientais [Tese de Doutorado]. São
3 Paulo: Universidade de São Paulo. 125 p.
- 4 47. Eterovick PC, Carnaval ACOQ, Borges-Nojosa DM, Silvano DL, Segalla MV, et
5 al. (2005) Amphibian declines in Brazil: an overview. *Biotropica* 37: 166-179.
- 6 48. Ron SR (2005) Predicting the distribution of the amphibian pathogen
7 *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* 37: 209-221.
- 8 49. Gahl MK, Longcore JE, Houlahan JE (2012) Varying responses of northeastern
9 North American amphibians to the chytrid pathogen *Batrachochytrium*
10 *dendrobatidis*. *Conservation Biology* 26: 135-141.
- 11 50. Searle C, Gervasi S, Hua J, Hammond J, Relyea R, et al. (2011) Differential host
12 susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian
13 pathogen. *Conservation Biology* 25: 965-974.
- 14 51. Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P (2010) The ecology and impact of
15 chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology &*
16 *Evolution* 25: 109-118.
- 17 52. Berger L, Speare R, Skerratt LF (2005) Distribution of *Batrachochytrium*
18 *dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea*
19 with severe chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 65-70.
- 20 53. Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, et al. (2007)
21 Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is
22 correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10: 409-417.
- 23 54. Lips KR (1999) Mass mortality and population declines of anurans at an upland
24 site in western Panama. *Conservation Biology* 13: 117-125.

- 1 55. Lips KR, Burrowes PA, Mendelson JR, G. PA (2005) Amphibian declines in Latin
2 America: widespread population declines, extinctions, and impacts. *Biotropica*
3 37: 163-165.
- 4 56. Mendelson JR, Lips KR, Gagliardo RW, Rabb GB, Collins JP, et al. (2006)
5 Biodiversity. Confronting amphibian declines and extinctions. *Science* 313:
6 48.
- 7 57. Ryan MJ, Lips KR, Eichholz MW (2008) Decline and extirpation of an
8 endangered Panamanian stream frog population (*Craugastor punctariolus*)
9 due to an outbreak of chytridiomycosis. *Biological Conservation* 141: 1636-
10 1647.
- 11 58. Smith KG, Lips KR, Chase JM (2009) Selecting for extinction: nonrandom
12 disease-associated extinction homogenizes amphibian biotas. *Ecology Letters*
13 12: 1069-1078.
- 14 59. Briggs CJ, Vredenburg VT, Knapp RA, Rachowicz LJ (2005) Investigating the
15 population-level effects of chytridiomycosis: An emerging infectious disease of
16 amphibians. *Ecology* 86: 3149-3159.
- 17 60. Retallick RWR, McCallum H, Speare R (2004) Endemic infection of the
18 amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *Plos Biology* 2:
19 1965-1971.
- 20 61. Kriger KM, Hero JM (2007) The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is
21 non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and*
22 *Distributions* 13: 781-788.
- 23 62. Baláz V, Voeroes J, Civis P, Vojar J, Hettyey A, et al. (2014) Assessing risk and
24 guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through

- 1 identification of taxonomic selectivity of infection. *Conservation Biology* 28:
2 213-223.
- 3 63. Pessier AP, Nichols DK, Longcore JE, Fuller MS (1999) Cutaneous
4 chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and white's tree
5 frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official*
6 *Publication of the American Association of Veterinary Laboratory*
7 *Diagnosticians, Inc* 11: 194-199.
- 8 64. Rowley JJJ, Alford RA (2007) Behaviour of Australian rainforest stream frogs
9 may affect the transmission of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic*
10 *Organisms* 77: 1-9.
- 11 65. Grundler MC, Toledo LF, Parra-Olea G, Haddad CFB, Giasson LOM, et al.
12 (2012) Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence
13 but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian
14 anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 173-184.
- 15 66. Bancroft BA, Han BA, Searle CL, Biga LM, Olson DH, et al. (2011) Species-level
16 correlates of susceptibility to the pathogenic amphibian fungus
17 *Batrachochytrium dendrobatidis* in the United States. *Biodiversity and*
18 *Conservation* 20: 1911-1920.
- 19 67. Kuris AM, Blaustein AR, Alio JJ (1980) Hosts as islands. *The American Naturalist*
20 116: 570-586.
- 21 68. Longcore JR, Longcore JE, Pessier AP, Halteman WA (2007) Chytridiomycosis
22 widespread in anurans of northeastern United States. *Journal of Wildlife*
23 *Management* 71: 435-444.

- 1 69. Rowley JJJ, Alford RA, Skerratt LF (2006) The amphibian chytrid
2 *Batrachochytrium dendrobatidis* occurs on freshwater shrimp in rain forest
3 streams in Northern Queensland, Australia. *EcoHealth* 3: 49-52.
- 4 70. Heyer WR, Rand AS, Cruz CAG, Peixoto OL, Nelson CE (1990) Frogs of
5 Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31: 231-410.
- 6 71. Pombal Jr JP, Haddad CFB (2005) Estratégias e modos reprodutivos de anuros
7 (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste
8 do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)* 45: 201-213.
- 9 72. Becker CG, Rodriguez D, Toledo LF, Longo AV, Lambertini C, et al. (2014)
10 Partitioning the net effect of host diversity on an emerging amphibian
11 pathogen. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 281: 1-7.
- 12 73. Lips KR, Reeve JD, Witters LR (2003) Ecological traits predicting amphibian
13 population declines in Central America. *Conservation Biology* 17: 1078-1088.
- 14 74. Williams SE, Hero JM (1998) Rainforest frogs of the Australian Wet Tropics:
15 guild classification and the ecological similarity of declining species.
16 *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*
17 265: 597-602.
- 18 75. Anstis M (2002) *Tadpoles of South-eastern Australia: a guide with keys*. Sydney:
19 New Holland Publishers.
- 20 76. Catenazzi A, Lehr E, Rodriguez LO, Vredenburg VT (2011) *Batrachochytrium*
21 *dendrobatidis* and the collapse of anuran species richness and abundance in
22 the upper Manu National Park, southeastern Peru. *Conservation Biology*
23 25(2): 382-391.
- 24 77. Paradis E (2011) *Analysis of Phylogenetics and Evolution with R*: Springer
25 Science & Business Media.

- 1 78. Beyer SE (2014) Effects of canopy cover on the landscape epidemiology of an
2 amphibian chytrid fungus [Dissertação de Mestrado]. Illinois: University of
3 Illinois at Urbana-Champaign. 53 p.
- 4 79. Puschendorf R, Hoskin CJ, Cashins SD, McDonald K, Skerratt LF, et al. (2011)
5 Environmental refuge from disease-driven amphibian extinction. *Conservation*
6 *Biology* 25: 956-964.
- 7 80. Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE (2004) Physiology of *Batrachochytrium*
8 *dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.
- 9 81. Haddad CFB, Prado CPA (2005) Reproductive modes in frogs and their
10 unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *Bioscience* 55: 207-217.
- 11 82. Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of Amphibians*. Baltimore, Maryland, EUA:
12 Johns Hopkins University Press. 613 p.
- 13 83. Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD (2004) Rapid quantitative
14 detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian
15 samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*
16 60: 141-148.
- 17 84. Lambertini C, Rodriguez D, Brito FB, Leite DS, Toledo LF (2013) Diagnóstico do
18 fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira* 2:
19 12-17.
- 20 85. Kopp K, Signorelli L, Bastos RP (2010) Distribuição temporal e diversidade de
21 modos reprodutivos de anfíbios anuros no Parque Nacional das Emas e
22 entorno, estado de Goiás, Brasil. *Iheringia Série Zoológica* 100: 192-200.
- 23 86. Haddad CF, Prado CP (2005) Reproductive modes in frogs and their unexpected
24 diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55: 207-217.

- 1 87. Meyer D, Zeileis A, Hornic K (2014) vcd: Visualizing Categorical Data. R
2 package version 13-2.
- 3 88. Crawley MJ (2012) The R Book: John Wiley & Sons. 1076 p.
- 4 89. Venables WN, Ripley BD (2002) Modern Applied Statistics with S: Springer.
- 5 90. Ver Hoef JM, Boveng PL (2007) Quasi-Poisson vs. negative binomial regression:
6 how should we model overdispersed count data? Ecology 88: 2766-2772.
- 7 91. Kamil B (2014) Multi-model inference. R package version 1.10.5.
- 8 92. Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a
9 practical information-theoretic approach: Springer. 488 p.
- 10 93. Pyron RA, Wiens JJ (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over
11 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and
12 caecilians. Molecular Phylogenetics and Evolution 61: 543-583.
- 13 94. Maddison WP, FitzJohn RG (2015) The unsolved challenge to phylogenetic
14 correlation tests for categorical characters. Systematic biology 64: 127-136.
- 15 95. Nascimento LB, Caramaschi U, Cruz CAG (2005) Taxonomic review of the
16 species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of
17 the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix*
18 *Steindachner*, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arquivos do Museu
19 Nacional 63: 297-320.
- 20 96. Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, et al. (2005)
21 Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae:
22 phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin of the American
23 Museum of Natural History 294: 1-240.
- 24 97. Felsenstein J (2004) Inferring phylogenies: Sinauer Associates Sunderland. 580
25 p.

- 1 98. Felsenstein J (1984) Distance methods for inferring phylogenies: a justification.
2 Evolution 38: 16-24.
- 3 99. Desdevises Y, Legendre P, Azouzi L, Morand S (2003) Quantifying
4 phylogenetically structured environmental variation. Evolution 57: 2647-2652.
- 5 100. Santos T, Diniz-Filho JAF, Rangel T, Bini LM (2012) Computes phylogenetic
6 eigenvectors regression (PVR) and phylogenetic signal-representation curve
7 (PSR) (with null and Brownian expectations). CRAN.
- 8 101. Diniz-Filho JAF, Sant'Ana CER, Bini LM (1998) An eigenvector method for
9 estimating phylogenetic inertia. Evolution 52: 1247-1262.
- 10 102. Revell LJ (2012) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology
11 (and other things). Methods in Ecology and Evolution 3: 217-223.
- 12 103. Blomberg SP, Garland T, Ives AR (2003) Testing for phylogenetic signal in
13 comparative data: behavioral traits are more labile. Evolution 57: 717-745.
- 14 104. Freckleton RP, Harvey PH, Pagel M (2002) Phylogenetic analysis and
15 comparative data: a test and review of evidence. The American Naturalist
16 160: 712-726.
- 17 105. Pagel M (1999) Inferring the historical patterns of biological evolution. Nature
18 401: 877-884.
- 19 106. R Core Group Team (2014) R: A language and environment for statistical
20 computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 21 107. Brem F, Lips KR (2008) *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns
22 among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during
23 epizootic and enzootic stages. Diseases of Aquatic Organisms 81: 189-202.
- 24 108. Morgan JAT, Vredenburg VT, Rachowicz LJ, Knapp RA, Stice MJ, et al. (2007)
25 Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*.

- 1 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
2 America 104: 13845-13850.
- 3 109. Ene IV, Bennett RJ (2014) The cryptic sexual strategies of human fungal
4 pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 12: 239-251.
- 5 110. Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF (2009) Global emergence of
6 *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space,
7 time, and host. *Annual Review of Microbiology* 63: 291-310.
- 8 111. Ramalho ACO, De Paula CD, Catão-Dias JL, Vilarinho B, Brandão RA (2013)
9 First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two endemic Cerrado hylids,
10 *Bokermannohyla pseudopseudis* and *Bokermannohyla sapiranga*, with
11 comments on chytridiomycosis spreading in Brazil. *North-Western Journal of*
12 *Zoology* 9.
- 13 112. Oda FH, Bastos RP, Lima M (2009) Taxocenose de anfíbios anuros no Cerrado
14 do Alto Tocantins, Niquelândia, Estado de Goiás: diversidade, distribuição
15 local e sazonalidade. *Biota Neotropica* 9: 219-232.
- 16 113. Rossa-Feres DC, Sawaya RJ, Faivovich J, Giovanelli JGR, Brasileiro CA, et al.
17 (2011) Anfíbios do estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e
18 perspectivas. *Biota Neotropica* 11: 1-19.
- 19 114. Becker CG, Zamudio KR (2011) Tropical amphibian populations experience
20 higher disease risk in natural habitats. *Proceedings of the National Academy*
21 *of Sciences* 108: 9893-9898.
- 22 115. Blaustein AR, Romansic JM, Scheessele EA, Han BA, Pessier AP, et al. (2005)
23 Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic
24 fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 19: 1460-1468.

- 1 116. Talley BL (2014) Host-pathogen ecology: effects of species ecology and
2 environmental factors on the intensity and distribution of disease among
3 illinois amphibians [Tese de Doutorado]. Illinois: Southern Illinois University
4 Carbondale. 117 p.
- 5 117. Barrionuevo S, Mangione S (2006) Chytridiomycosis in two species of
6 *Telmatobius* (Anura : Leptodactylidae) from Argentina. Diseases of Aquatic
7 Organisms 73: 171-174.
- 8 118. Santoro GRCC, Brandão RA (2014) Reproductive modes, habitat use, and
9 richness of anurans from Chapada dos Veadeiros, central Brazil. North-
10 Western Journal of Zoology 10: 365-373.
- 11 119. Bustamante HM, Livo LJ, Carey C (2010) Effects of temperature and hydric
12 environment on survival of the panamanian golden frog infected with a
13 pathogenic chytrid fungus. Integrative Zoology 5: 143-153.
- 14 120. Rowley JJJ, Alford RA (2013) Hot bodies protect amphibians against chytrid
15 infection in nature. Scientific Reports 3.
- 16 121. Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G (2003) Emerging disease of
17 amphibians cured by elevated body temperature. Diseases of Aquatic
18 Organisms 55: 65-67.
- 19 122. Gardner SN, Thomas MB (2002) Costs and benefits of fighting infection in
20 locusts. Evolutionary Ecology Research 4: 109-131.
- 21 123. Blanford S, Thomas MB (1999) Host thermal biology: the key to understanding
22 host-pathogen interactions and microbial pest control? Agricultural and Forest
23 Entomology 1: 195-202.

- 1 124. Richards-Zawacki CL (2010) Thermoregulatory behaviour affects prevalence of
2 chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs.
3 Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 277: 519-528.
- 4 125. Stevenson RD (1985) Body size and limits to the daily range of body
5 temperature in terrestrial ectotherms. American Naturalist 125: 102-117.
- 6 126. Murray KA, Skerratt LF, Speare R, McCallum H (2009) Impact and dynamics of
7 disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus,
8 *Batrachochytrium dendrobatidis*. Conservation Biology 23: 1242-1252.
- 9 127. Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ (2010) Dynamics of an
10 emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions.
11 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
12 America 107: 9689-9694.
- 13 128. Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT (2010) Enzootic and epizootic dynamics
14 of the chytrid fungal pathogen of amphibians. Proceedings of the National
15 Academy of Sciences of the United States of America 107: 9695-9700.
- 16 129. Retallick RWR, Miera V (2007) Strain differences in the amphibian chytrid
17 *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of
18 infection. Diseases of Aquatic Organisms 75: 201-207.
- 19 130. Tattersall GJ, Eterovick PC, de Andrade DV (2006) Tribute to RG Boutilier: skin
20 colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai*
21 (Bokermann 1956). Journal of Experimental Biology 209: 1185-1196.
- 22 131. Borges FJA, Juliano RF (2007) Distribuição espacial e temporal de uma
23 comunidade de anuros do município de Morrinhos, Goiás, Brasil (Amphibia:
24 Anura). Neotropical Biology and Conservation 2: 21-27.

- 1 132. Sugai JLMM (2010) Comunidade de anuros e influencia da estrutura ambiental
2 de veredas na composição de espécies em parte da bacia do Alto Taquari,
3 norte do Mato Grosso do Sul [Dissertação de Mestrado]. Mato Grosso do Sul:
4 Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 77 p.
- 5 133. Cardoso AJ, Haddad CFB (1984) Variabilidade acústica em diferentes
6 populações e interações agressivas de *Hyla minuta* (Amphibia, Anura).
7 Ciência e Cultura 36: 1393-1399.
- 8 134. Toledo LF, Zina J, Haddad CFB (2003) Distribuição espacial e temporal de uma
9 comunidade de anfíbios anuros do município de Rio Claro, São Paulo, Brasil.
10 Holos Environment 3: 136-149.
- 11 135. Ribeiro-Júnior JW, Bertoluci J (2009) Anurans of the cerrado of the Estação
12 Ecológica and the Floresta Estadual de Assis, southeastern Brazil. Biota
13 neotropica 9: 207-216.
- 14 136. Araujo CO, Condez TH, Sawaya RJ (2009) Anfíbios Anuros do Parque
15 Estadual das Furnas do Bom Jesus, sudeste do Brasil, e suas relações com
16 outras taxocenoses no Brasil. Biota Neotropica 9: 77-98.
- 17 137. Guimarães LD, Bastos RP (2003) Vocalizações e interações acústicas em *Hyla*
18 *raniceps* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. Iheringia Série
19 Zoologia 93: 149-158.
- 20 138. Toledo L, Haddad C (2005) Reproductive biology of *Scinax fuscomarginatus*
21 (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. Journal of Natural History 39: 3029-
22 3037.
- 23 139. Filadelfo T, Zimbres BQC, Dantas PT, Mello-Patiu CA, Brandão RA (2013) Egg
24 clutches and predation of *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) nests in a
25 temporary pond in Central Brazil. Herpetology Notes 6: 485-488.

- 1 140. Costa TB, Guimarães LD, Bastos RP (2010) Territorial and mating behavior in
2 *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) at a temporary pond in west-central
3 Brazil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 9: 99-108.
- 4 141. Brasileiro CA, Martins M (2006) Breeding biology of *Physalaemus centralis*
5 Bokermann, 1962 (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Brazil. *Journal of*
6 *Natural History* 40: 1199-1209.
- 7 142. Giaretta AA, Facure KG (2009) Habitat, egg-laying behaviour, eggs and
8 tadpoles of four sympatric species of *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae).
9 *Journal of Natural History* 43: 995-1009.
- 10 143. Thomé MTC, Brasileiro CA (2007) Dimorfismo sexual, uso do ambiente e
11 abundância sazonal de *Elachistocleis* cf. *ovalis* (Anura: Microhylidae) em um
12 remanescente de Cerrado no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota*
13 *Neotropica* 7: 27-33.
- 14 144. Rodrigues AP (2008) Reprodução de *Leptodactylus ocellatus* (Anura,
15 Leptodactylidae), uma espécie com cuidado maternal à prole [Dissertação de
16 Mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 35 p.
- 17 145. Paula A (2012) Estrutura e dinâmica de uma comunidade de anuros no hotspot
18 de biodiversidade do Cerrado [Dissertação de Mestrado]. Brasília:
19 Universidade de Brasília. 71 p.
- 20 146. Bastos RP, Bueno MAF, Dutra SL, Lima LP (2003) Padrões de vocalização de
21 anúncio em cinco espécies de Hylidae (Amphibia: Anura) do Brasil central.
22 *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Série Zoologia*
23 16: 39-51.
- 24 147. Freitas EB, Carvalho CB, Faria RG, Batista RC, Batista CC, et al. (2008) Nicho
25 ecológico e aspectos da história natural de *Phyllomedusa azurea* (Anura:

- 1 Hylidae, Phyllomedusinae) no Cerrado do Brasil Central. *Biota Neotropica* 8:
2 101-110.
- 3 148. Pupin NC (2011) Padrões de alocação reprodutiva em espécies de
4 *Physalaemus* (Anura: Leiuperidae) de áreas abertas e florestadas:
5 Universidade Estadual Paulista. 99 p.
- 6 149. Prado CPA (2004) Estratégias reprodutivas em uma comunidade de anuros no
7 Pantanal, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil [Tese de Doutorado]. Rio
8 Claro: Universidade Estadual Paulista. 151 p.
- 9 150. Diniz-Filho J, Bini L, Bastos R, Vieira C, Souza M, et al. (2004) Anurans from a
10 local assemblage in Central Brazil: linking local processes with
11 macroecological patterns. *Brazilian Journal of Biology* 64: 41-52.
- 12 151. Brasileiro CA, Sawaya RJ, Kiefer MC, Martins M (2005) Amphibians of an open
13 Cerrado fragment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 5: 93-109.
- 14 152. Pombal Jr JP, Haddad CF (2005) Estratégias e modos reprodutivos de anuros
15 (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste
16 do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)* 45: 201-213.
- 17 153. Sabagh L, Ferreira V, Rocha C (2010) Living together, sometimes feeding in a
18 similar way: the case of the syntopic hylid frogs *Hypsiboas raniceps* and
19 *Scinax acuminatus* (Anura: Hylidae) in the Pantanal of Miranda, Mato Grosso
20 do Sul State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 70: 955-959.
- 21 154. Araujo CO, Condez TH, Haddad CFB (2007) Amphibia, Anura, *Barycholos*
22 *ternetzi*, *Chaunus rubescens*, and *Scinax canastrensis*: Distribution extension,
23 new state record. *Check List* 3: 153-155.

- 1 155. Toledo LF, Loebmann D, Haddad CF (2010) Revalidation and redescription of
2 *Elachistocleis cesarii* (Miranda-Ribeiro, 1920) (Anura: Microhylidae). Zootaxa
3 2418: 50-60.
- 4 156. Barreto LL (1993) Padrões reprodutivos de uma comunidade de anuros (Anura:
5 Hylidae, Microhylidae), em uma poça permanente no Distrito Federal
6 [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. 55 p.
- 7 157. Rodrigues DJ, Uetanabaro M, Lopes FS (2007) Breeding biology of
8 *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 and *P. sauvagii* Boulenger, 1882 (Anura)
9 from the Cerrado, central Brazil. Journal of Natural History 41: 1841-1851.
- 10 158. Moreira GRS (1993) Padrões de reprodução, atividade e alimentação de
11 anuros em duas localidades do Brasil Central [Dissertação de Mestrado].
12 Brasília: Universidade de Brasília. 56 p.
- 13 159. Vasconcellos MM, Colli GR (2009) Factors affecting the population dynamics of
14 two toads (Anura: Bufonidae) in a seasonal neotropical savanna. Copeia
15 2009: 266-276.
- 16 160. Giaretta AA, Menin M, Facure KG, Kokubum MNC, Oliveira Filho JC (2008)
17 Species richness, relative abundance, and habitat of reproduction of terrestrial
18 frogs in the Triângulo Mineiro region, Cerrado biome, southeastern Brazil.
19 Iheringia Série Zoologia 98: 181-188.
- 20 161. Provete DB, Garey MV, Silva F, Rossa-Feres D (2011) Anurofauna do noroeste
21 paulista: lista de espécies e chave de identificação para adultos. Biota 11:
22 377-391.
- 23 162. Arzabe C (1999) Reproductive activity patterns of anurans in two different
24 altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. Revista Brasileira de Zoologia
25 16: 851-864.

- 1 163. Pereira LFTR (2004) Biologia reprodutiva de *Scinax fuscomarginatus* em um
2 fragmento de Cerrado no sudeste do Brasil [Dissertação de Mestrado]. Rio
3 Claro: Universidade Estadual Paulista. 78 p.
- 4 164. Prado CA, Uetanabaro M, Haddad CF (2005) Breeding activity patterns,
5 reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal
6 environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia* 26: 211-221.
- 7 165. Vieira WLS, Santana GG, Arzabe C (2009) Diversity of reproductive modes in
8 anurans communities in the Caatinga (dryland) of northeastern Brazil.
9 *Biodiversity and Conservation* 18: 55-66.
- 10

1 Tabela 1 - Características ecológicas, prevalência e intensidade da infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* em 16 espécies
 2 de anuros no Cerrado do Brasil central. A unidade de medida para Massa é grama (g) e para CRU (comprimento rostro-uróstilo) é
 3 milímetro (mm). Reprodução: E (explosiva), P (prolongada); Sítio de desova: Ag (água), Fo (folhagem), Ch (chão); Modo
 4 reprodutivo: segundo Haddad [86], Ninhos: Ag (água), Fo (folhagem), Ea (espuma na água), Es (espuma subterrânea); N: número
 5 de indivíduos coletados; Pre: prevalência; Int: intensidade.

Espécie	Massa	CRU	Índice aquático	Reprodução	Sítio de desova	Ninhos	Modo repr.	N	Pre	Int
<i>Dendropsophus jimi</i>	1,41 ¹⁴⁵	20,35 ^{150,151}	1 ^{131,132}	P ^{132,85}	Ag ^{85,161}	Ag ^{85,161}	1 ^{85,161}	46	10	1092,31
<i>Dendropsophus rubicundulus</i>	1,14 ¹⁴⁵	19,25 ¹⁵⁰	1 ¹³³	P ¹⁴⁵	Ag ¹⁶¹	Ag ¹⁶¹	1 ¹⁶¹	21	0	0
<i>Dendropsophus minutus</i>	0,95 ¹⁴⁵	2,52 ^{136,150,151,152}	1 ^{131,134,135}	P ^{132,85,156}	Ag ^{134,135,136}	Ag ^{134,135,136}	1 ^{134,152,86}	30	3	6,38
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	5,68 ¹⁴⁵	53,17 ^{136,150,151}	1 ^{134,135,136}	P ^{132,134,136,85,156}	Ag ^{134,135}	Ag ^{134,135}	1 ^{134,85}	45	18	48,49
<i>Hypsiboas raniceps</i>	7,36 ¹⁴⁶	55,22 ^{150,153}	1 ^{131,132,137}	P ^{132,85}	Ag ¹⁶²	Ag ¹⁶²	1 ^{85,162}	2	0	0
<i>Scinax fuscomarginatus</i>	1,14 ¹⁴⁵	21,89 ^{138,150,151,152}	1 ^{131,132,134,135}	P ^{138,85}	Ag ^{135,163}	Ag ^{135,163}	1 ^{134,152}	32	60	58,79
<i>Scinax fuscovarius</i>	3,08 ^{136,145}	39,65 ^{136,151}	1 ^{132,134,135,136}	E ^{132,134,85}	Ag ^{135,136}	Ag ^{135,136}	1 ^{134,86}	31	15	152,92
<i>Phyllomedusa azurea</i>	2,49 ¹⁴⁷	36,45 ¹⁴⁷	1 ^{132,139,140}	P ^{132,157}	Fo ^{132,139}	Fo ^{132,139}	24 ⁸⁶	1	0	0
<i>Physalaemus centralis</i>	5,30 ¹⁴⁸	34,72 ^{141,150,151}	1 ^{134,141}	E ^{134,85}	Ag ¹⁴¹	Ea ¹⁴¹	11 ^{134,86}	15	7	0,26
<i>Physalaemus cuvieri</i>	3,77 ¹⁴⁵	28,67 ^{136,150,151,152}	2 ^{131,134,135}	P ^{132,134,141,85,158}	Ag ^{135,136}	Ea ^{135,136}	11 ^{134,152,86}	28	56	358,86
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	1,75 ¹⁵⁴	17,1 ^{136,142,154}	2 ¹⁴²	P ¹⁴²	Ag ¹⁴²	Ag ¹⁴²	1 ¹⁶⁵	21	0	0
<i>Rhinella schneideri</i>	242,1 ¹³⁶	143,2 ^{136,150,151}	2 ^{131,134,135}	E ^{135,136,85,158,159}	Ag ¹⁶⁴	Ag ¹⁶⁴	1 ^{134,164}	1	0	0
<i>Rhinella rubescens</i>	74,54 ¹⁵⁴	95,86 ^{150,154}	2 ¹³⁶	E ¹⁵⁹	Ag ¹⁶⁴	Ag ¹⁶⁴	1 ¹⁶⁴	17	21	15,54
<i>Elachistocleis cesarii</i>	3,6 ¹⁴³	28,81 ^{143,155}	2 ¹⁴³	P ^{155,85}	Ag ¹³⁴	Ag ¹³⁴	1 ¹³⁴	16	33	1607,58
<i>Leptodactylus fuscus</i>	8,55 ^{136,149}	46,95 ^{136,150,151}	2 ^{131,134,135,136}	P ^{132,136,85,160}	Ch ¹³²	Es ¹³²	30 ^{164,165}	10	0	0

Leptodactylus latrans 103,7^{136,149} 90,90^{136,150,151,152} 2^{135,144} P^{144,85} Ag¹⁴⁴ Ea¹⁴⁴ 11^{152,85} 2 0 0

1 Os números sobrescritos são as referências bibliográficas.

1

2 Tabela 2 - Seleção, coeficientes médios e importância dos preditores de modelos lineares generalizados (GLMs) relacionando a
 3 prevalência da infecção por *Bd* a características ecológicas de 16 espécies de anuros no Cerrado do Brasil central. Apenas os
 4 modelos com $\Delta AIC_c \leq 4$ são mostrados. CRU: comprimento rostro-uróstilo, AIC_c : coeficiente de informação de Akaike corrigido
 5 para pequenas amostras, ΔAIC_c : diferença no valor de AIC_c entre o modelo candidato e o melhor modelo (menor AIC_c), $wAIC_c$:
 6 peso de Akaike, i.e., verossimilhança normalizada ou o peso da evidência em favor do modelo, β : coeficientes médios, SE : erro-
 7 padrão, I : importância relativa, i.e., soma do $wAIC_c$ de todos os modelos contendo a variável.

Modelos	df	AIC_c	ΔAIC_c	$wAIC_c$		
Reprodução	2	70,19	0,00	0,22		
Índice aquático + Massa + Reprodução + CRU	5	70,78	0,59	0,16		
Índice aquático + Massa + Reprodução	4	71,19	1,00	0,13		
Índice aquático + Reprodução	3	71,84	1,65	0,10		
Massa + Reprodução	3	72,01	1,81	0,09		
Massa + Reprodução + CRU	4	72,76	2,56	0,06		
Reprodução + CRU	3	73,27	3,08	0,05		
Modo reprodutivo + Reprodução	3	73,27	3,08	0,05		
Índice aquático + Massa + Modo reprodutivo + Reprodução + CRU	6	73,36	3,16	0,04		
Interseção	1	73,65	3,46	0,04		
Massa+ CRU	3	74,01	3,82	0,03		
Desova + Reprodução	4	74,06	3,87	0,03		
Parâmetros		β	SE	z	P	I
Interseção		-1,820	1,042	1,688	0,091	–
Reprodução (prolongada)		-0,975	0,495	1,854	0,064	0,93
Índice aquático		0,395	0,565	0,680	0,497	0,44
Massa		-0,018	0,026	0,697	0,486	0,52
CRU		0,010	0,020	0,546	0,585	0,35
Modo reprodutivo		-0,002	0,014	0,153	0,878	0,09
Desova (chão)		-0,542	483,054	0,001	0,999	0,03
Desova (folha)		-0,493	702,928	0,001	0,999	(0,03)

8

1 Tabela 3 - Seleção, coeficientes médios e importância dos preditores de modelos
 2 lineares generalizados (GLMs) relacionando a intensidade da infecção por *Bd* a
 3 características ecológicas de 16 espécies de anuros no Cerrado do Brasil central.
 4 Apenas os modelos com $\Delta AIC_c \leq 4$ são mostrados. CRU: comprimento rostro-
 5 uróstilo, AIC_c : coeficiente de informação de Akaike corrigido para pequenas
 6 amostras, ΔAIC_c : diferença no valor de AIC_c entre o modelo candidato e o melhor
 7 modelo (menor AIC_c), $wAIC_c$: peso de Akaike, i.e., verossimilhança normalizada ou
 8 peso da evidência em favor do modelo, β : coeficientes médios, SE : erro-padrão, I :
 9 importância relativa, i.e., soma do $wAIC_c$ de todos os modelos contendo a variável.

Modelo	df	AIC_c	ΔAIC_c	$wAIC_c$
Interseção	2	136,70	0,00	0,38
Massa	3	136,87	0,17	0,35
Índice aquático	3	139,62	2,92	0,09
Desova	4	140,08	3,38	0,07
Reprodução + CRU	4	140,10	3,40	0,07
Massa + reprodução	4	140,64	3,94	0,05

Parâmetros	β	SE	z	P	I
Interseção	5,622	1,621	3,260	0,001	–
Massa	-0,020	0,030	0,646	0,518	0,40
Índice aquático	0,055	0,505	0,101	0,920	0,09
Desova (chão)	-1,688	1926,000	0,001	0,999	0,07
Desova (folha)	-1,688	1926,000	0,001	0,999	(0,07)
Reprodução (prolongada)	-0,037	0,794	0,043	0,965	0,12
CRU	-0,005	0,021	0,250	0,802	0,07

10

11

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

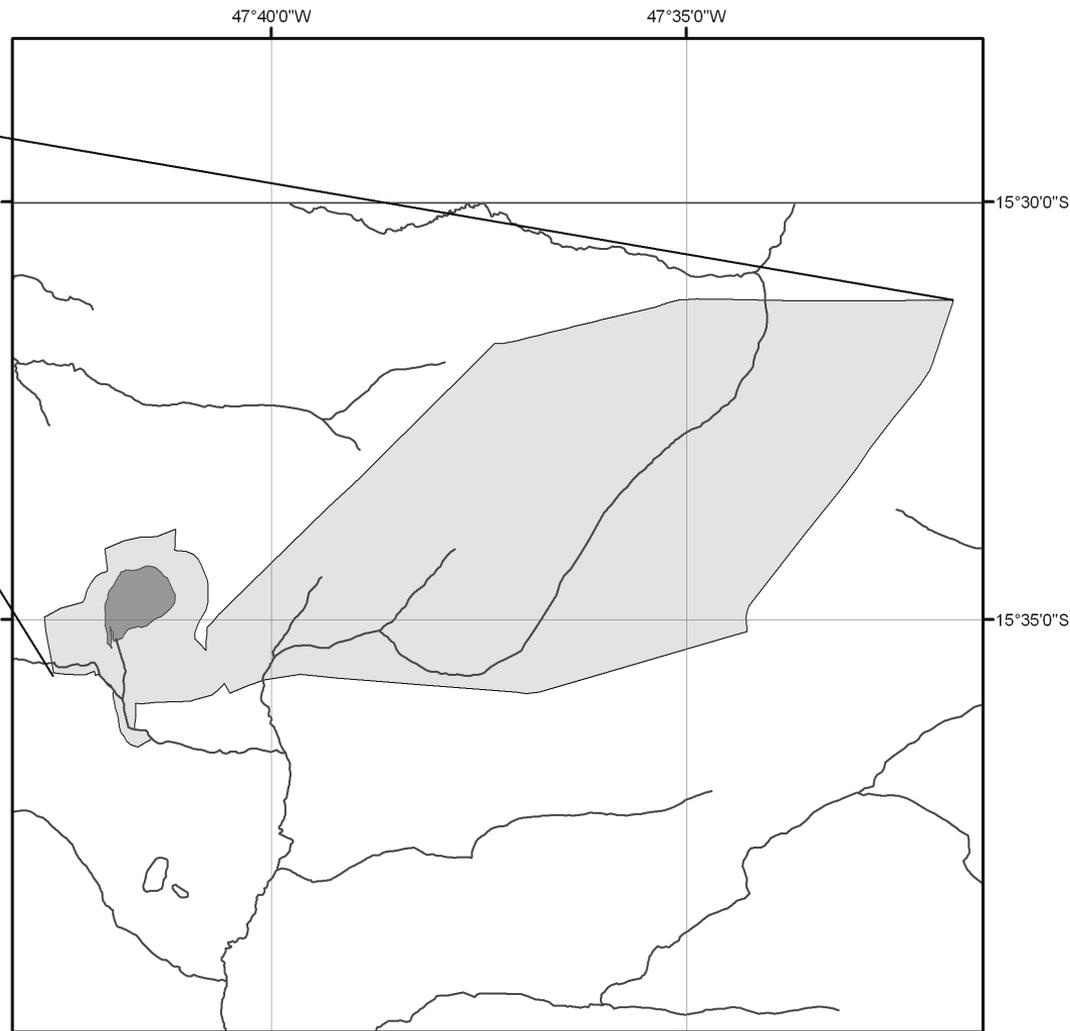
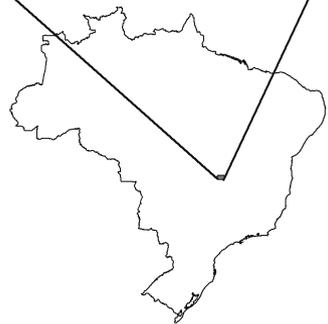
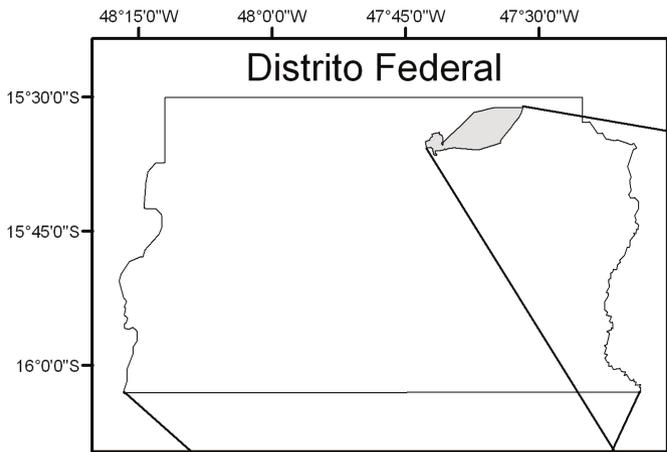
Legendas das Figuras

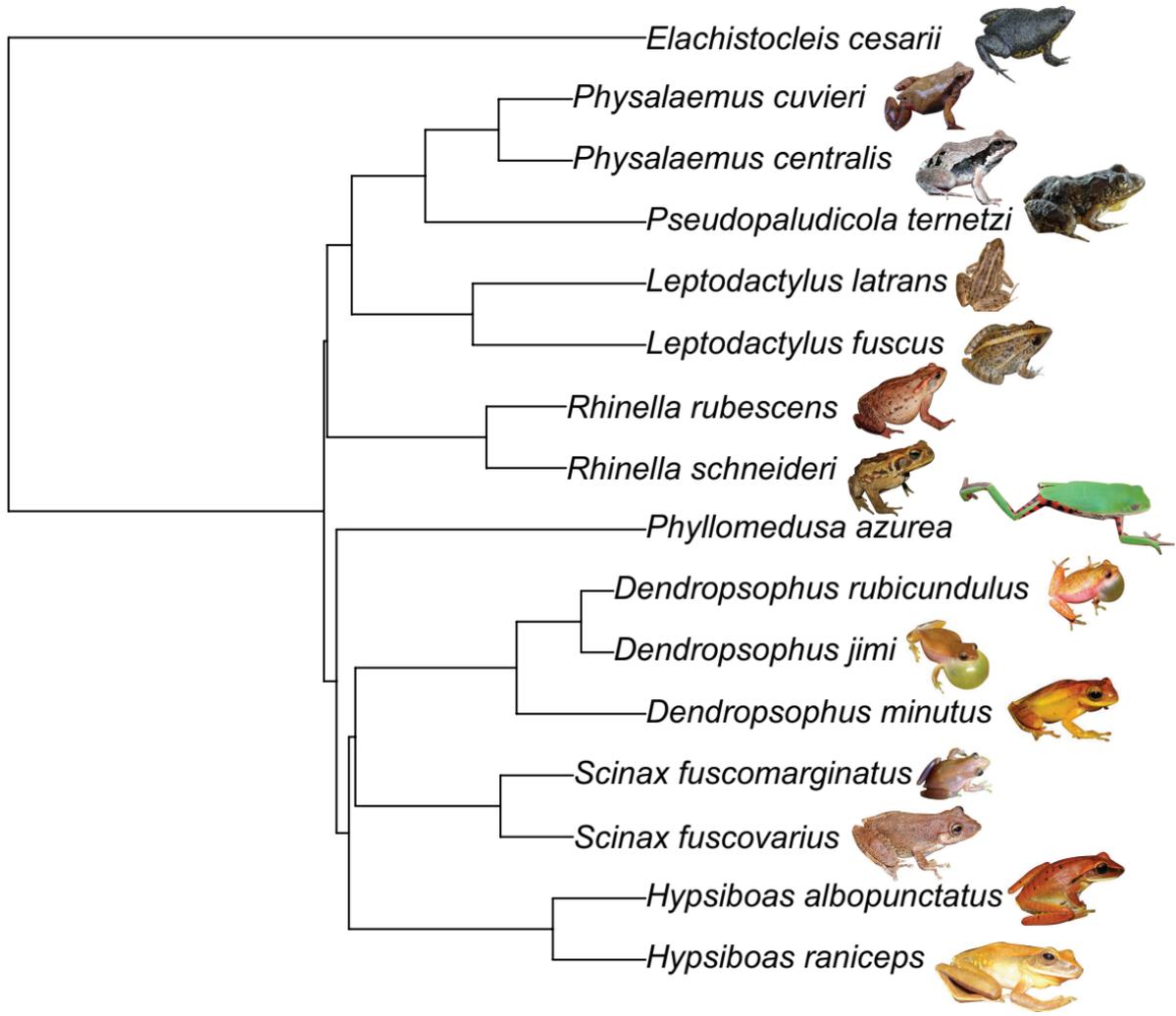
Figura 1 - Mapa localizando a Lagoa Bonita na Estação Ecológica de Águas Emendadas, Distrito Federal, Brasil, onde os anuros foram amostrados.

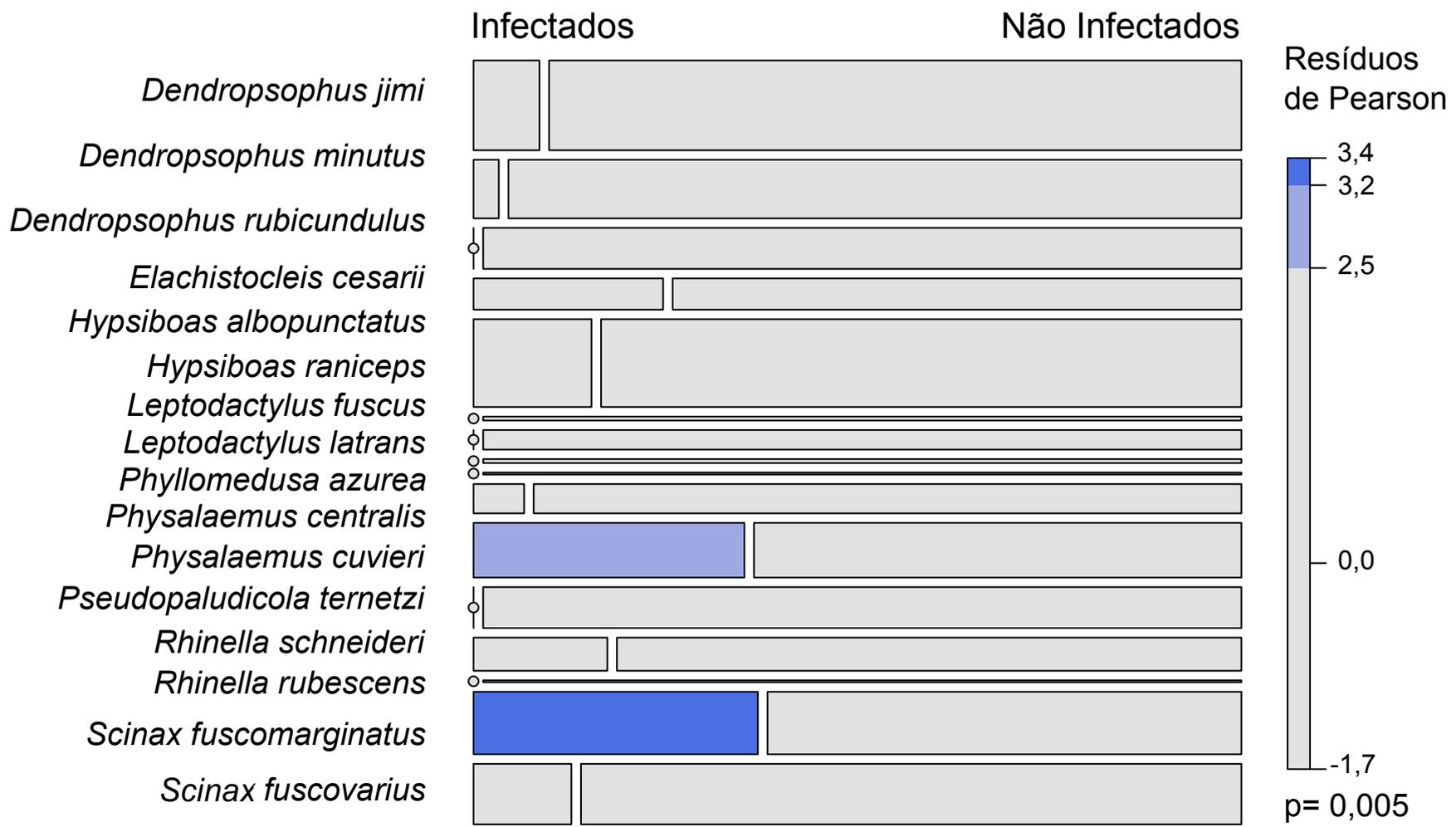
Figura 2 - Hipótese filogenética para as espécies de anuros amostradas na Estação Ecológica de Águas Emendadas, Distrito Federal, Brasil.

Figura 3 - Gráfico de mosaico do teste de permutação condicional com a soma dos quadrados dos resíduos de Pearson, evidenciando um número maior de indivíduos infectados nas espécies *Scinax fuscomarginatus* e *Physalaemus cuvieri* do que esperado sob a hipótese de independência.

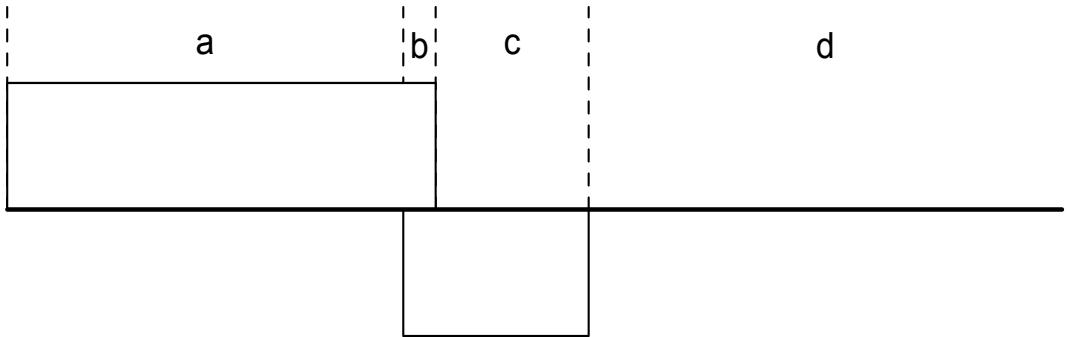
Figura 4 - Partição de variação da intensidade (I) e prevalência de infecção (II) entre as características ecológicas (a), características filogenéticas (b), características compartilhadas entre a ecologia e a filogenia das espécies (c) e variação residual (d).







I) PREVALÊNCIA



II) INTENSIDADE

