

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TALES REIS FREITAS

**IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* NO
TEGUMENTO DE *Rhinella granulosa* (Spix, 1824) E *Rhinella jimi*
(Stevaux, 2002) (ANURA: BUFONIDAE) DO SEMIÁRIDO
NORDESTINO**

PICOS – PI
Junho de 2018

TALES REIS FREITAS

**IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* NO
TEGUMENTO DE *Rhinella granulosa* (Spix, 1824) E *Rhinella jimi*
(Stevaux, 2002) (ANURA: BUFONIDAE) DO SEMIÁRIDO
NORDESTINO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura Plena
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio
Nunes de Barros, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Mariluce Gonçalves
Fonseca

PICOS – PI
Junho de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

F862e Freitas, Tales Reis.

Identificação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* no tegumento de *Rhinella granulosa* (Spix, 1824) E *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (ANURA: BUFONIDAE) do semiárido nordestino. / Tales Reis Freitas. – 2018.

29 f.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2019.
Orientador(A): Profa. Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca.

1. Doenças Fúngicas. 2. Análise Molecular. 3. Amphibia.
I. Título.

CDD 616.969

TALES REIS FREITAS

**IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis* NO
TEGUMENTO DE *Rhinella granulosa* (Spix, 1824) E *Rhinella jimi*
(Stevaux, 2002) (ANURA: BUFONIDAE) DO SEMIÁRIDO
NORDESTINO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura
Plena em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Piauí,
Campus Senador Helvídio Nunes de
Barros, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Mariluce
Gonçalves Fonseca

Aprovado em 14 de Junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Mariluce Gonçalves Fonseca

Prof.^a Dr.^a Mariluce Gonçalves Fonseca
(Orientadora)

Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima

Primeiro avaliador: Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima
UFPI – CSHNB

Paulo César Lima Sales

Segundo avaliador: Prof. Dr. Paulo César Lima Sales
UFPI – CSHNB

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu Deus, que me ajuda, me sustenta, me capacita e me esforça.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao criador de todo universo por ter me elucidado essa tão grandiosa etapa da minha vida.

Também agradeço à minha família pelo apoio e suporte concedido, minha mãe Dionísia Rosa Freitas, meu pai Oscar Holanda Freitas, meu irmão Tiago Ramon Reis Freitas, minha tia Nenzinha e minha avó Rosa Maria dos Reis.

Agradeço também a Afonso Naftali Silva, amigo e irmão que ganhei durante esta trajetória de graduação, pelas ajudas constantes e conselhos que me abriram novos horizontes para minha vida. Agradeço também a Benó Santos e Silva, por ter me incentivado a fazer o curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, pelos conselhos sábios que torna a vida do ser humano mais clara e mais bela. Agradeço também a Fabelina Karollyne Silva dos Santos, amiga que também ganhei durante a trajetória da graduação.

Agradeço ao professor Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva pela ajuda com a análise molecular.

Também agradeço à professora Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca por ter aceitado prontamente a minha solicitação de orientação, o que me possibilitou a oportunidade de estudar a Herpetoparasitologia de anfíbios.

Muito obrigado a todos!!!

Porque eu, o SENHOR, teu Deus, te tomo pela tua mão direita e te digo: não temas, que eu te ajudo.

Isaías 41.13

RESUMO

O Brasil possui a maior biodiversidade de anfíbios do mundo com 1080 espécies descritas, sendo a ordem anura a mais diversificada, apresentando 1039 espécies. Atualmente com as notáveis e constantes degradações que os ecossistemas naturais vêm sofrendo, especialmente em virtude de ações antrópicas, o declínio populacional em diversas espécies de anfíbios em escala global tem sido observado. Anfíbios estão susceptíveis a vários grupos de patógenos, apesar de apresentar um tegumento que lhes confere resistência a microorganismos, o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* *Bd* é capaz de colonizar seu tegumento e peças queratinizadas, o que vem causando maior impacto na vida de seus hospedeiros. O *Bd* já foi identificado em algumas regiões do Brasil, predominantemente no Sul, Sudeste e, em menor escala, no Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país. O *Bd* parasita partes da pele que possui queratina, com isso, a pele torna-se muito espessa devido a alterações celulares chamadas de hiperplasia. Estas alterações na pele são fatais para os anfíbios, pois provocam distúrbios fisiológicos severos, levando o animal a óbito. Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar se o fungo *Bd* estava presente no tegumento de *Rhinella granulosa* e *Rhinella jimi* do semiárido piauiense por meio de biologia molecular. Para a realização deste trabalho foi analisado indivíduos da espécie *R. granulosa* e *R. jimi* na UFPI – Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB). As coletas foram realizadas em Outubro e Novembro de 2017. Os indivíduos encontrados foram submetidos ao Swabbing nas regiões interdigitais e inguinais, locais onde o *Bd* coloniza. Para a avaliação por biologia molecular foi utilizado o Kit DNeasy Blood & Tissue Kits para a extração do DNA. Após a extração o DNA foi submetido a PCR Real-time 7500 fast usando sybr green da Promega. O *Bd* foi positivo para quatro amostras de *R. granulosa* e positivo para seis amostras de *R. jimi* analisadas. Este estudo foi o primeiro a registrar o *Bd* em anfíbios no estado do Piauí, sendo este o segundo estado do nordeste onde o *Bd* foi detectado.

PALAVRAS-CHAVE: Doenças Fúngicas; Análise Molecular; Amphibia; Piauí; Brasil.

ABSTRACT

Brazil has the largest amphibian biodiversity in the world with 1080 species described, with the anuran order being the most diversified, with 1039 species. Nowadays, with the remarkable and constant degradations that natural ecosystems have been suffering, especially due to anthropic actions, the population decline in several amphibian species on a global scale has been observed. Amphibians are susceptible to several groups of pathogens, despite presenting a tegument that gives them resistance to microorganisms, such as the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* *Bd*, which has been causing the greatest impact on the life of their hosts. *Bd* has already been identified in some regions of Brazil, predominantly in the South, Southeast and, to a lesser extent, in the Center-West, North and Northeast of the country. The *Bd* parasites parts of the skin that possess keratin, with this, the skin becomes very thick due to cellular changes called hyperplasia. These changes in the skin are fatal to amphibians, as they cause severe physiological disturbances, leading the animal to death. Thus, the objective of this work was to identify if the *Bd* fungus was present in the integument of *Rhinella granulosa* and *Rhinella jimi* of the Piauí semi-arid by means of molecular biology. For the accomplishment of this work, individuals of the species *R. granulosa* and *R. jimi* in the UFPI - Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB) were analyzed. The collections were carried out in October and November of 2017. The individuals found were submitted to Swabbing in the interdigital and inguinal regions, where *Bd* colonizes. The DNeasy Blood & Tissue Kits Kit for DNA extraction was used for molecular biology evaluation. After extraction the DNA was subjected to Real-time PCR 7500 fast using sybr green from Promega. *Bd* was positive for four *R. granulosa* samples and positive for six *R. jimi* samples analyzed. This study was the first to record the *Bd* in amphibians in the state of Piauí, being this the second state of the northeast where *Bd* was detected.

KEY WORDS: Fungal Diseases; Molecular Analysis; Amphibia; Piaui; Brazil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Sistemática dos anfíbios.....	13
3.2 <i>Rhinella granulosa</i> (Spix, 1824).....	13
3.3 <i>R. jimi</i> (Stevaux, 2002).....	14
3.4 Importância ecológica dos anfíbios e o declínio de suas populações.....	15
3.5 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (<i>Bd</i>).....	16
3.5.1 Ciclo de vida do <i>Bd</i>	16
3.6 Impacto do <i>Bd</i> em seus hospedeiros.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Coleta de material biológico para identificação do <i>Bd</i>	20
4.2 Preparação do meio de cultura	21
4.3 Extração do DNA.....	21
4.3.1 Procedimentos para extração do DNA.....	21
4.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativa – RT-qPCR.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade de anfíbios do mundo com 1080 espécies descritas, sendo a ordem Anura a mais diversificada, apresentando 1039 espécies (SEGALLA et al., 2016), entretanto a notável e constante degradação que os ecossistemas naturais vêm sofrendo, especialmente em virtude de ações antrópicas, tem sido considerada um fator de declínio populacional em diversas espécies de anfíbios em escala global (BEEBEE, 1996; YOUNG et al., 2000).

Os parasitas também têm grande parcela na mortalidade e declínio dos anfíbios como tem citado vários autores (CAREY et al., 2003; DASZAK et al., 2003). Esses parasitas são importantes, pois os mesmos causam grande impacto na vida de seus hospedeiros (CHANDRA; GUPTA, 2007), podendo até mesmo levar a extinção de algumas espécies de hospedeiros (LINDENFORS et al., 2007).

Convém destacar que a pele dos anfíbios são de suma importância, pois desempenha uma série de funções vitais (LEITE et al., 2005). Mas, devido ao fato da pele desses animais estarem em contato direto com ambientes favoráveis (esgotos, margens de rios e possas de água) tem contribuído para a presença de patógenos como: fungos, vírus, bactérias e tremátodos, acarretando assim diversas doenças nesses animais (CAREY, 1993; JOHNSON et al., 1999; KIESECKER et al., 2001; PRATES; JUNIOR, 2000).

Ainda convém destacar que dos patógenos que ocorrem em anfíbios os fungos estão sendo apontados como o principal agente de declínio de populações em diversas partes do mundo. (CARNAVAL et al., 2006). Esse declive também já pode ser observado no Brasil. Dentre esses fungos o *Batrachochytrium dendrobatidis* *Bd* é o que vem causando maior impacto na vida de seus hospedeiros (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999; FISHER; GARNER, 2007). Esse fungo em anfíbios é letal ou causa alterações anatomorfológicas (GARMYN et al., 2012). Deste modo, torna-se importante a investigação do *Bd* nas diversas regiões do Brasil.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Identificar a ocorrência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) em duas espécie de Bufonídeos do semiárido nordestino.

2.2 Objetivo Específico

- Identificar a ocorrência de *Bd* em *R. granulosa* (Spix, 1824) por meio de biologia molecular;
- Identificar a ocorrência de *Bd* em *R. jimi* (Stevaux, 2002) por meio de biologia molecular.

3 REVISÃO DE LITERATURA

POUGH; JANIS; HEISER (2008) elucidam que os anfíbios são os primeiros tetrápodes a ocuparem o ambiente terrestre. Seu termo em questão tem origem grega (*anphi*, duas; *bios*, vida) o qual é dividido em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Urodela (Caudata) e Gymnophiona (Apoda). Alguns possuem ciclo biológico constituído de uma fase aquática larval (girino) e outra terrestre (adulto). Os adultos podem ser semiaquáticos, terrestres e ou arborícolas.

3.1 Sistemática dos Anfíbios

A classe Amphibia é representada por animais vertebrados terrestres (DUELLMAN, 1999). Atualmente são descritas 7,561 espécies de anfíbios no mundo, sendo a ordem Anura a mais diversificada entre os anfíbios (AMPHIBIAWEB, 2016). Eles ocupam ampla gama de ambientes, e isso está relacionado à combinação entre adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais de cada espécie (STEBBINS; COHEN, 1997).

O Brasil possui a maior biodiversidade de anfíbios do mundo com 1080 espécies descritas, a ordem Anura, mais diversificada, apresenta 1039 espécies, estão distribuídas em 20 Famílias, e cerca de 60% são endêmicas do território brasileiro. Convém destacar, que dentre as Famílias da ordem anura no Brasil a Família Bufonidae é a terceira com maior quantidade de espécies descritas, 85 espécies, sendo 40 pertencentes ao gênero *Rhinella* (SEGALLA et al., 2016).

3.2 *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)

No Brasil uma das espécies do gênero *Rhinella* é a *R. granulosa* (Spix, 1824) a qual pode ser localizada nas regiões Sudeste (Minas Gerais e Espírito Santo) e Nordeste (com exceção no Maranhão) e esse espécime é predominante no Bioma Caatinga (NARVAES; RODRIGUES, 2009), presente no estado do Piauí e na cidade de Picos (ROBERTO; RIBEIRO; LOEBMANN, 2013).

Benício e Fonseca (2014) destacam que *R. granulosa* (Spix 1824) tem dorso marrom com manchas irregulares mais escuras e ventre esbranquiçado ou creme com pontos negros. E

as glândulas paratóides localizadas atrás dos olhos, e são pouco aparentes. Pode ser localizada tanto dentro d`água quanto vocalizando no solo. E apresenta comprimento rostro-cloacal (CRC) médio de 46,0 mm para o município de Picos (Figura 1).



Figura 1. Espécime macho de *Rhinella granulosa* vocalizando. Fonte: Silva, 2017.

3.3 *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002)

No Brasil essa espécie tem distribuição por todo o nordeste, e a mesma é endêmica do bioma Caatinga. Presente no estado do Piauí e na cidade de Picos (ROBERTO; RIBEIRO; LOEBMANN, 2013).

Esta espécie tem comprimento rostro-cloacal (CRC) médio de 103,0 mm. E pode ser encontrada principalmente em ambiente antropizado. O dorso tem coloração com fundo em diferentes tonalidades de marrom a bege com manchas negras, e em alguns espécimes pode ser visualizada uma linha clara vertical. O ventre tem cor creme com diminutos pontos marrons, com ou sem manchas acinzentadas. E as glândulas paratóides são bem desenvolvidas (BENÍCIO; FONSECA, 2014) (Figura 2).



Figura 2. Espécime fêmea de *Rhinella jimi*. Fonte: Autor, 2017.

3.4 Importância ecológica dos anfíbios e o declínio de suas populações

Os anfíbios apresentam suma importância para as relações tróficas e ecológicas, pois são predadores em ambientes aquáticos e terrestres. Também servem de alimento para uma ampla gama de animais desde invertebrados, peixes, répteis, aves, mamíferos e algumas espécies de anfíbios. Ecologicamente, os anfíbios são considerados indicadores sensíveis a diversos fatores ambientais como aquecimento global, aumento da radiação ultravioleta (em consequência da diminuição da camada de ozônio), introdução de espécies exóticas (competição, predação, transporte de patógenos), modificação e fragmentação dos habitats, contaminação tóxica das águas (BLAUSTEIN, 1994; BLAUSTEIN; WAKE, 1995; ALFORD; RICHARDS, 1999; DONELLY; CRUMP, 1998; YOUNG ET AL., 2001; WEYGOLDT, 1989; BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003).

A notável e constante degradação que os ecossistemas naturais vêm sofrendo em virtude de ações antrópicas implica na alteração ou eliminação completa dos micro habitats específicos explorados pelos anuros, sendo considerada o principal fator responsável pelos declínios populacionais observados em diversas espécies de anfíbios em escala global (BEEBEE, 1996; YOUNG et al., 2001).

Segundo Marzluff (2001) o desmatamento causado pelo crescimento urbano tem causado grandes perturbações para os anfíbios, pois tem restringido seus habitats nativos a pequenas áreas. Além disso, o desmatamento para o avanço da fronteira agrícola, o fogo e os projetos de desenvolvimento como estradas, indústrias e empreendimentos imobiliários também tem causado modificações ambientais (SILVANO; SEGALA, 2005). E outros fatores como a poluição ambiental, introdução de predadores e competidores (DASZAK et al., 1999), contaminação química, comercialização de espécies e aumento na incidência de radiação UV (SEMLITSCH, 2003, MCMENAMIN et al., 2008, MANN et al., 2009) tem contribuído para o declínio desses animais.

Os parasitas também possuem grande parcela na mortalidade e declínio dos anfíbios como tem citado vários autores (CAREY et al., 2003; DASZAK et al., 2003). Esses parasitas são importantes, pois os mesmos causam grande impacto na vida de seus hospedeiros (CHANDRA; GUPTA, 2007), podendo até mesmo levar a extinção de algumas espécies de hospedeiros (LINDENFORS et al., 2007).

Dentre os parasitas os fungos estão sendo indicadas como o principal agente de declínio de populações de anfíbios em diversas partes do mundo, e esse declive também já

pode ser observado no Brasil (CARNAVAL et al., 2006). Sendo que o *Batrachochytrium dendrobatidis* (PESSIER; NICHOLS, 1999) é o fungo que vem causando maior impacto na vida de seus hospedeiros (FISHER; GARNER, 2007), o qual pode ser letal em anfíbios (GARMYN et al., 2012).

Com isso, as consequências deste declínio podem afetar drasticamente outros organismos importantes ecologicamente bem como os seres humanos (BLAUSTEIN et al., 2011; TOLEDO; CARVALHO-E-SILVA; SÁNCHEZ, 2010).

3.5 *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

O *Batrachochytrium dendrobatidis* é um fungo que pertence ao Filo *Chytridiomycota*, Classe *Chytridiomycetes* e Ordem *Chytridiales* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Em 1998 foi isolado de espécies de *Dendrobates azureus* encontrados mortos no *National Zoological Park, Washington, DC, USA* e o mesmo foi nomeado com a seguinte etiologia: *Batracho* (do grego = frog); *chytrium* (Referente ao filo *Chytridiomycota*); *dendrobatidis* (Referente à espécie na qual o fungo foi primeiramente encontrado e identificado). Recebe ainda a abreviatura “Bd” (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). E o *Bd* é um dos únicos integrantes da família *Chytridiaceae* que possui a capacidade de infectar indivíduos vertebrados. E o mesmo infecta tecido queratinizado em rãs adultas e nos girinos afeta as cavidades orais (AGUIAR, 2016).

3.5.1 Ciclo de vida do *Bd*

O *Bd* apresenta dois ciclos de vida: o estágio livre natante, representado pelo zoósporo, e o estágio fixo ao substrato, representado pelo zoosporângio. No estágio natante os zoósporos móveis, nas formas ovóides que vivem na água ou lama penetram na pele do anfíbio, iniciando assim a colonização nas células queratinizadas do mesmo. E com essa colonização na derme os zoósporo amadurece, sofre processo de encistamento ou enquistamento, no qual o zoósporo se encapsula e inicia a formação de estruturas ramificadas, denominadas hifas, que se estendem pela pele, formando por fim, um corpo reprodutor esférico, o zoosporângio, que no futuro sofrerá ruptura que provocará a liberação dos novos zoósporos. Cada zoosporângio produz um tubo de descarga única, que atravessa a pele e libera zoósporos maduros (Figura 3) (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).



Figura 3. O ciclo de vida do *Bd*. Na porção independente do ciclo, os zoósporos flagelados são livres nadantes. Na porção dependente, os zoósporos se encistam e se desenvolvem em esporângios, que produzem e liberam novos zoósporos. Fonte: Rosenblum et al., 2008; PNAS, 105:17034-17039.

Com a liberação dos zoósporos, o indivíduo será infectado novamente e poderá infectar outros indivíduos que estejam próximos ou em contato com ele, que pode ser através da água ou por contato direto através do acasalamento (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004).

Convém salientar que em indivíduos adultos o *Bd* é encontrado em maior quantidade na região inguinal e nas membranas interdigitais dos membros posteriores. Já nos girinos o *Bd* aparece no aparato bucal. Sendo que aproximadamente 90% dos casos da despigmentação do aparato bucal de girinos é provocada pelo *Bd* (KNAPP; MORGAN, 2006) (Figura 4).



Figura 4. Prancha que representa o aumento na intensidade de infecção por *Bd* em girinos da espécie *Hylodes phyllodes*, sendo da esquerda para a direita: infecção branda à grave. Fonte: Yuri Messias (2001).

Segundo Piotrowski; Annis; Longcore (2004), a temperatura e potencial hidrogênio (pH) ideais para o crescimento do fungo são entre, 4 a 25°C e entre 4 e 8 pH.

3.6 Impacto do *Bd* em seus hospedeiros

O *Bd* está dizimando várias populações de espécies de anuros (SILVANO; SEGALLA, 2005).

Voyles et al., (2009) relatam que as infecções ocasionadas pelo *Bd* ocorrem no interior das camadas mais externas da pele. E com essa infecção a pele torna-se espessa, devido alterações celulares denominadas de hiperplasia, que consiste no superávit de células desordenadas e hiperqueratose. Essa hiperqueratose vai gerar rigidez para a pele, devido ao aumento da queratina nas células. Convém salientar que estas alterações são letais na pele dos anfíbios, pois é através da pele que os anfíbios realizam suas funções vitais como a respiração, transporte de água e solutos, regulação da temperatura corpórea, defesa contra ataques de microrganismos, predadores e absorção de sais minerais importante (eletrólitos), tais como o potássio e o sódio. E quando os eletrólitos resultantes da pele danificada pelo *Bd* estão em níveis exorbitantes provocam distúrbios fisiológicos severos levando o animal ao óbito.

As alterações causada pelo *Bd*, no geral são discretas, porém os sintomas mais aparentes são lesões na região ventral, dorsal, inguinal, nas patas e entre os dedos. Além da hiperplasia, pode ocorrer necrose de células pertencentes à epiderme. Referente aos sintomas clínicos é possível observar em animais infectados descoloração da pele, uma postura anormal, letargia e anorexia (VOYLES; ROSENBLUM; BERGER, 2011).

O *Bd* já foi diagnosticado na África, Austrália, Europa, América do Norte, América Central e América do Sul (BERGER et al., 1998; LIPS, 1998; LONGCORE, 1999; LA MARCA et al., 2005). Convém salientar, que populações de anuros do gênero *Atelopus* (LAMPO; BARRIO-AMOROS; HAN, 2007) e os sapo-flecha, estão sofrendo severas perdas de indivíduos na América Central. Na Austrália, algumas espécies de pererecas do gênero *Litoria* (KRIGER; PEREOGLOU; HERO, 2007), *Rheobatrachus silus* (LIEM, 1973) e *Rheobatrachus vitellinus* também estão em declive (MAHONY, TYLER; DAVIES, 1984). porém ainda são pouco os estudos sabe a distribuição atual e histórica do *Bd* em todo mundo. Na América do Sul, o *Bd* foi diagnosticado em algumas localidades do Equador (RON; MERINO-VITERI, 2000; MERINO-VITERI, 2001; RON, 2005), no Uruguai (MAZZONI et al., 2003), Venezuela (BONACCORSO et al., 2003), Peru (SEIMON et al., 2005), Argentina (HERRERA; STECIOW; NATALE, 2005) e Brasil (CARNAVAL et al., 2005; TOLEDO et al., 2006).

No Brasil, são poucos os relatos publicados sobre o declínio de anfíbios até o momento (HEYER et al., 1988; WEYGOLDT, 1989; BERTOLUCI; HEYER, 1995; GUIX et

al., 1998; POMBAL; HADDAD, 1999; IZECKSOHN; CARVALHO; SILVA, 2001; ETEROVICK et al., 2005). A maior parte dos relatos foram observados na Mata Atlântica (MYERS et al., 2000). Convém destacar que o *Bd* já foi identificado em sete, dos 27 estados brasileiros, incluindo São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do sul e Pernambuco (TOLEDO et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal do Piauí *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB). A sede municipal tem as coordenadas geográficas de 07°5'6.07"S de latitude sul e 41° 26'11.14"O de longitude oeste de Greenwich e distância acerca de 306 km de Teresina (AGUIAR; GOMES, 2004).

4.1 Coleta de material biológico para identificação do *Bd*

Para a realização deste trabalho foi feita a coleta de material biológico da pele de espécimes de *R. granulosa* e *R. jimi* encontrados em ambientes úmidos do *Campus* entre o período de Outubro a Novembro de 2017 totalizando 40 amostras coletadas. A coleta do material biológico ocorreu com o passar de Swabbing (hastes flexíveis com algodão em uma das pontas; zaragatoas) sob a pele dos anfíbios no local onde foram encontrados, sendo soltos logo após. Todas as coletas foram feitas no período noturno. Sob autorização fundação chico Mendes SISBIO, IBAMA Licença 22508-2.

Em cada indivíduo o Swabbing foi passado 5 vezes em cada uma das regiões: inguinal direita e esquerda membranas interdigitais dos membros inferiores e superiores direito e esquerdo. Locais onde o fungo *Bd* coloniza (HYATT et al., 2007). Também foi utilizado luvas, pinças, tubos de ensaio e solução fisiológica.

Após realizados os Swabbings o material de coleta foi encaminhado para o Laboratório de Pesquisa I e encubado com soro fisiológico a -4°C para posterior análise molecular (Figura 5).



Figura 5. Realização do swab. Fonte: autor, 2018.

4.2 Preparação do meio de cultura

Para o crescimento dos fungos em meio de cultura artificial foi utilizado 65g de Sabourad Dextrose Ágar para um litro de água destilada e essa mistura foi aquecida (110°C), e logo após, submetida a um agitador magnético. Com isso a mistura foi adicionada em placas de Petri e posteriormente o material foi semeado.

Para o semeio do material foi utilizado a técnica de esgotamento de modo a isolar as colônias de fungos, e em seguida as placas foram encubadas por dois dias em uma geladeira à 24°C a 25°C para que ocorresse o crescimento dos fungos.

4.3 Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizado o Kit DNeasy Blood e Tissue da qiagem seguindo o protocolo do fabricante.

4.3.1 Procedimentos para extração do DNA

I- Material em tubo de 1,5 ml > Adição de 180 µl de tampão ATL > Macerado > Adição de 20 µl de Proteinase K > Vortexado > Incubação 56°C por 40 minutos.

II- Adição de 200 µl de Buffer AL > Misturado no vortex > Incubação a 56°C por 10 minutos.

III- Adição de 200 µl de etanol (96% a 100%) > Mistura no vortex.

IV- Transferência do material do tubo de 1,5 para uma coluna de rotação com tubo de coleta de 2 ml > Centrifugação a 8000 rpm > Descarte da coluna.

V- coluna de rotação para um novo tubo de 2 ml > Adição de 500 µl de Buffer AW1 > Centrifugação por 1 minuto a 8000rpm > Descarte do fluxo e o tubo de coleta.

VI- Transferência da coluna de rotação para um novo tubo de coleta de 2ml > Adição de 500 µl de Buffer AW2 > Centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm > Descarte do tubo de 2ml.

VII- Transferência da coluna de rotação para um tubo de coleta de 1,5 ml.

VIII- Adição de 200 µl de Buffer AE > Incubação por 1 minuto a temperatura de 15°C a 25°C > Centrifugação por 1 minuto a 8000rpm.

4.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativa – RT-qPCR

Todas as amostras de DNA foram amplificadas utilizando o kit de PCR quantitativo GoTaq qPCR Master Mix conforme especificações do fabricante. Para as reações de qPCR

foram utilizadas as seguintes condições: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de qPCR, a presença de DNA do fungo foi verificada pela amplificação do material no aparelho ABI 7500 Fast.

Para uma placa de 96 poços, deve ser preparado um “reactionmastermix” contendo: 1250 µL de Taqman Master Mix(AppliedBiosystems®), 125 µL do primer (Boyle et al. 2004)ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3')concentrado à 18 µM, 125 µL do primer 5.8S Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3')concentrado à 18 µM, 125 Mlda sonda ChytrMGB2 (5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3')concentrada à 5 µM, 275 µL de água destilada, e 100 µLde BSA (Bovine Albumin Serum/ Soro Albumina Bovina). Adicionar20 µL do mix em cada poço da placa, e adicionar 5 µL do DNA extraído e diluído 1:10 a partir da segunda coluna da placa. Preparar também o controle negativo sem DNA no último poço da primeira coluna da placa, e adicionar os padrões nas diluições 10³, 10², 10, 1 e 10⁻¹ g.e. (sendo os dois últimos em duplicata) para a construção da curva padrão nos 7 poçosda primeira coluna da placa. A cepa de Bdutilizada para a curvapadrão deve ser identificada nos estudos, visto que a carga de infecção estimada pela reação de qPCR varia com a cepa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a técnica utilizada (PCR Real-time) foi possível observar o *Bd* em quatro amostras de *R. granulosa*, e em 6 amostras de *R. jimi*. (Figura 6) e (Figura 7).



Figura 6. Gráfico de amplificação da região ribossomal ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') do fungo *Bd*. Fonte: Silva, 2018.

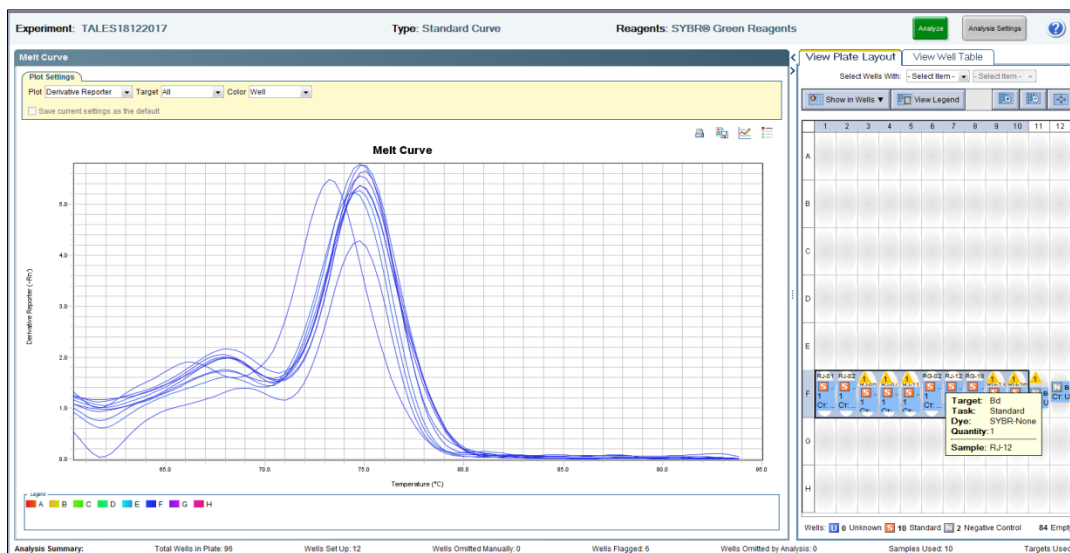


Figura 7. Curva de Melting. Fonte: Silva, 2018.

Os resultados desse estudo corroboram para aumentar os relatos de *Bd* identificados em anuros no Brasil, sendo que esse relato é o segundo descrito para a região Nordeste e o primeiro caso descrito para o Piauí. O *Bd* já foi identificado em sete dos 27 estados

brasileiros, incluindo São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do sul e Pernambuco (TOLEDO et al., 2006).

O Brasil apresenta limitados artigos sobre o declínio de anfíbios (HEYER et al., 1988; WEYGOLDT, 1989; BERTOLUCI; HEYER, 1995; GUIX et al., 1998; POMBAL; HADDAD, 1999; IZECKSOHN; CARVALHO; SILVA, 2001; ETEROVICK et al., 2005). E esse fato está atrelado ao fato de não existir um programa de monitoramento populacional em larga escala e, portanto, quase nada se sabe sobre os tamanhos populacionais das diferentes espécies de anfíbios e sobre suas oscilações (ETEROVICK et al., 2005).

O registro mais antigo do fungo *Bd* no Brasil data de 1981, mas até os dias de hoje são poucos os dados divulgados sobre o *Bd*. E a maioria dos casos foram identificados em áreas de Mata Atlântica (TOLEDO et al., 2006). Ainda não existe registro que vincule diretamente o fungo ao declínio de anuros nessas localidades, mas animais já foram encontrados na natureza bastante debilitados e a presença do fungo em sua pele foi comprovada. E convém destacar que a mata atlântica faz transição com o cerrado e este está localizado predominantemente no Planalto Central, compreende os Estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Tocantins, São Paulo, Distrito Federal e Piauí (RIBEIRO; WALTER, 1998; DURIGAN et al., 2002), e essa transição pode ter facilitado que o fungo se espalhasse para as demais localidades (RON, 2005).

Informações sobre a distribuição de *Bd* em grandes biomas brasileiros como o Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica ainda é bastante limitado. A mesma falta de informação é válida para América do Sul como um todo, onde apenas cerca de 20 espécies foram relatadas como infectadas em seis países (HANSELMANN et al., 2004; HERRERA et al., 2005; SEIMON et al., 2005; RON, 2005). E além de serem limitadas grande parte dos estudos com o *Bd* são realizados com técnicas histológicas, essas técnicas porém podem gerar falsos negativos por causa da sua sensibilidade limitada, e em vista a isso pode gerar incerteza nos dados (PUSCHENDORF; BOLAÑOS, 2006). Já a técnica de PCR segundo Boyle et al., (2007) é uma técnica de alta sensibilidade, pois possui uma especificidade grande se comparado com outras técnicas de diagnósticos. A técnica não gera falsos negativos (PCR Real-time) e foi utilizada para a elucidação dessa pesquisa.

Fazendo assim necessários mais estudos relacionados a esse tema para que tenhamos um maior conhecimento a nível global a respeito do *Bd*, e através desses estudos termos um maior monitoramento do impacto que esse fungo vem causando na vida seus hospedeiros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desse trabalho foi de fundamental importância, pois foi possível fazer o primeiro registro de *Bd* para o estado do Piauí região do semiárido, e segundo estado do Nordeste a ser detectado nas espécies *Rhinella granulosa* e *R. jimi*.

Os dados desse estudo permitem o monitoramento do *Bd* nas regiões do Brasil, pois são limitados os estudos sobre esse fungo para região nordeste.

O registro do *Bd* no semiárido nordestino amplia a distribuição geográfica do *Bd* no Nordeste brasileiro, o que indica a resistência do *Bd*, um fungo aquático em áreas secas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. V. Sazonalidade, Fatores Ambientais e Comportamento do Anfítrio Vinculado ao Risco de Doença em Tadpoles de Córrego. **Herpetológica**, v. 72, n. 2, p. 98-106, 2016.

AGUIAR, R. B.; GOMES, J. R. C. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado do Piauí**, Fortaleza: [s. n.], Ed. 1, 2004.

ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian decline: a problem in applied ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics** v. 30, p. 133-65, 1999.

AMPHIBIAWEB. **Número atual de espécies de anfíbios**. 2016. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/about/index.html>>. Acessado em: 09/09/2017.

BONACCORSO, E. et al. Chytridiomycosis as a possible cause of population declines in *Atelopus cruciger* (Anura: Bufonidae). **Herpetological Review**, v. 34, n. 4, p. 331–334, 2003.

BLAUSTEIN, A. R. Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 85-97. 1994.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B. The puzzle of declining amphibian populations. **Scientific American**, v. 272, n. 4, p. 52-57, 1995.

BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. J. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers Ecology Environment**, v. 2, n. 1, p. 87-94, 2003.

BLAUSTEIN, A. R. et al. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, p. 108-119, 2011.

BEEBEE, T. J. C. **Ecology and conservation of amphibians**. London: Chapman & Hall. p. 214, 1996.

BENÍCIO, R. A.; FONSECA, M. G. **Guia ilustrado de anfíbios e répteis de Picos-Piauí**. Teresina, EDUFPI, 2014.

BERGER, L. et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 9031-9036.

BERTOLUCI, J.; W. R.; HEYER. Boraceia Update. **Froglog**, v. 14, n. 3. p. 2-3, 1995.

BOYLE, D. G. et al. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, n. 2, p. 141-148, 2004.

BOYLE, A. H. D. et al. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 73, n. 3, p. 175-192, 2007.

CARNAVAL, A. C. O. Q. et al. Chytrid fungus infects high-altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. **Froglog**, v. 70, n. 3, 2005.

CARNAVAL, A.C. O. Q. et al. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **EcoHealth**, v. 3, p. 41-48, 2006.

CHANDRA, P.; GUPTA, N. Habitat preference and seasonal fluctuations in the helminthfauna of amphibian hosts of Rohilkhand Zone, India. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 69-78, 2007.

CAREY, C. Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. **Conservation biology**, v. 7, p. 355-362, 1993.

CAREY, C. et al **Pathogens, infectious disease, and immune defenses**. In: Semlitsch, R. D. Amphibian conservation. Smithsonian Institution, Washington, DC, p. 127-136 2003.

Daszak, et al. Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 735-748, 1999.

Daszak, et al. Infectious disease and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v. 9, p.141–150, 2003.

DONELLY, M. A.; CRUMP, M. L. Potential effects of climate change on two neotropical amphibian assemblages, **Climatic Change**, v. 39, n. 2-3, p. 541-561, 1998.

DUELLMAN, W. E. 1999. Global distribution of amphibians: patterns, conservation and future challenges. In: _____. **Patterns of distribution of amphibians: A global perspective**. The John Hopkins University Press, Baltimore e London, p.1-30.

DURIGAN, G. et al. (2002.) **Sementes e mudas de árvores tropicais**. São Paulo: Ed. 2, Páginas e Letras.

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

FISCHER, M. C.; GARNER, T. W. J. The relationship between the emergence of *Batrachytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced species. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 2-9, 2007.

GARMYN, et al. Waterfowl: Potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PLoS One**, v. 7 e355038, 2012.

GUIX, J. C. et al. Natural history and conservation of bufonids in four Atlantic rainforest areas of southeastern Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 1998.

HANSELMANN, R. et al. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. **Biological Conservation**, v. 120, p. 115–119, 2004.

- HERRERA, R. A.; STECIOW, M. M.; NATALE, G. S. Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Argentina. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 3, p. 247–252, 2005.
- HEYER, W. R. et al. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. **Biotropica**, v. 20, p. 230–235, 1988.
- HYATT, A. D. et al. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, n. 3 p. 175-192, 2007.
- IZECKSOHN, E.; CARVALHO-E-SILVA, S. P. (2001). **Anfíbios do Município do Rio de Janeiro**. Editora: Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 148.
- JOHNSON, P. T. et al. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. **Science**, v. 284, p. 802-804, 1999.
- KIESECKE, J. M. et al. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, p. 681-684, 2001.
- KRIGER, K. M.; PEREOGLOU, F.; HERO, J. M. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. **Conservation Biology**, v. 21, n. 5, p. 1280-1290, 2007.
- KNAPP, R. A.; MORGAN, J. A. T. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. **Copeia**, v. 2, p. 188-197, 2006.
- LA MARCA, E. Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). **Biotropica**, v. 37, n. 2, p. 190-201, 2005.
- LAMPO, M.; BARRIO-AMOROS, C.; HAN, B. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the recently rediscovered *Atelopus mucubajiensis* (Anura, Bufonidae), a critically endangered frog from the Venezuelan Andes. **EcoHealth**, v. 3, n. 4, p. 299-302, 2007.
- LEITE, J. R. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565-73, 2005.
- LIEM, D. S. "A new genus of frog of the family Leptodactylidae from south-east Queensland, Australia." **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 16, n. 3, p. 459-470, 1973.
- LIPS, K. R. Decline of a tropical montane amphibian fauna. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 106-117, 1998.
- LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, p. 219-227, 1999.
- LINDERFORS, P. et al. Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, p. 496-509, 2007.

MAHONY, M.; TYLER, M. J.; DAVIES, M. "A new species of the genus *Rheobatrachus* (Anura: Leptodactylidae) from Queensland." **Transactions of the Royal Society of South Australia**, v. 108, n. 3, p. 155-162, 1984.

MANN, R. et al. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental pollution**, v. 157, n. 11, p. 2903-2927, 2009.

MARZLUFF, J. M.; EWING, K. Restoration of Fragmented Landscapes for the Conservation of Birds: A General Framework and Specific Recommendations for Urbanizing Landscapes. **Restoration Ecology**, v. 9, n. 3, p. 280-292, 2001.

MAZZONI R. et al. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 995–998, 2003.

MERINO-VITERI, A. (2001). **Análisis de Posibles Causas de las Disminuciones de Poblaciones de Anfibios en los Andes del Ecuador**. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito.

MCMENAMIN, S. K. et al. Climate change and wetland dissection cause amphibian decline in Yellowstone National Park. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 44, p. 16988-16993, 2008.

MYERS, N. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 24, p. 853–858, 2000.

NARVAES, P.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. **Arquivos de Zoologia**, v. 40, n. 1, p. 1-73, 2009.

PRATES, M. V.; JUNIOR, C. B. Peptídeos Antimicrobianos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 30-36, 2000.

PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, S. L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96, n. 1 p. 9-15, 2004.

POMBAL, J. P. J. R.; HADDAD, C. F. B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. **Copeia**, n. 4, p. 1014–1026, 1999.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. 4ª ed – São Paulo: Atheneu, 2008.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. (1998). Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Ed. Brasília: Embrapa Cerrados. P. 87-166.

ROBERTO, I. J.; RIBEIRO, S. C.; LOEBMANN, D. Amphibians of the state of Piauí, Northeastern Brazil: a preliminary assessment. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 1, p. 322-330, 2013.

RON, S.; MERINO-VITERI, A. Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. **Froglog**, v. 42, p. 2–3, 2000.

RON, S. R. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. **Biotropica**, v. 37, n. 2, p. 209-221, 2005.

SEGALLA, M. V. et al. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 34-36, 2016.

SEMLITSCH, R. D. **Amphibian Conservation**. Smithsonian Institution. Unites States of America, 2003.

SEIMON, T. A. (2005) Identification of chytridiomycosis in *Telmatobius marmoratus* at 4,450 m in the Cordillera Vilcanota of southern Peru. In: LAVILLA, E. O.; DE LA RIVA, I. **Studies on the Andean Frogs of the Genera Telmatobius and Batrachophrynus**. Monografias de Herpetologia 7, editors: Valencia: Asociación Herpetológica Española, p. 275–283.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservation of Brazilian Amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653-658, 2005.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. New Jersey: Princeton University Press, p. 316, 1997.

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

TOLEDO, L. F.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; SÁNCHEZ, C. A revisão do Código Florestal Brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 1-4, 2010.

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

VOYLES, J.; ROSENBLUM, E. B.; BERGER, L. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. **Microbes and infection**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2011.

WEYGOLDT, P. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations?. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 24, n. 4, p. 249-255, 1989.

YOUNG, B. E. et al. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, Seattle, v. 15, n. 5, p. 1213-1223, 2000.

YOUNG, B. E. et al. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, v. 15, n. 5, p. 1213-1223, 2001.



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
 () Dissertação
 (X) Monografia
 () Artigo

Eu, Tales Reis Freitas,
 autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de
 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,
 gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação
Identificação do fungo Batrachochytrium dendrobatidis
no tegumento de Rhinella granulosa (Spix, 1824) e
Rhinella jimi (Stamps, 2002) (Amura: Bufonidae) do se-
miário meridional
 de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título
 de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 05 de junho de 2018.

Tales Reis Freitas

Assinatura

Tales Reis Freitas

Assinatura