

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

RENATO AUGUSTO MARTINS

**INFLUÊNCIA DA DESCONEXÃO DE HABITATS NA QUITRIDOMICOSE E NO
MICROBIOMA CUTÂNEO DE ANFÍBIOS ANUROS**

SÃO CARLOS

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA**

RENATO AUGUSTO MARTINS

**INFLUÊNCIA DA DESCONEXÃO DE HABITATS NA QUITRIDOMICOSE E NO
MICROBIOMA CUTÂNEO DE ANFÍBIOS ANUROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna, para obtenção do título de mestre profissional em Conservação da Fauna.

Orientador: Dr. Vinícius de Avelar São-Pedro

Co-orientador: Dr. Carlos Guilherme Becker

Colaborador: Dr. Célio F. B. Haddad

SÃO CARLOS

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Renato Augusto Martins, realizada em 15/05/2020, com o título: INFLUÊNCIA DA DESCONEXÃO DE HABITAT NA QUITRIDOMICOSE E NO MICROBIOMA CUTÂNEO DE ANFÍBIOS ANUROS

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Vinicius de Avelar São Pedro (UFSCar), participando presencialmente

Prof. Dr. Alexandre Camargo Martensen (UFSCar), participando à distância

Prof. Dr. Daniel Christofer Medina López (UNICAMP), participando à distância

Prof. Dr. Carlos Guilherme Becker (UAB), participando à distância

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Julgadora, consta no Sistema Eletrônico de Informações da UFSCar (SEI) e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna.

Dedico este trabalho à Ciência brasileira, que atravessa tempos difíceis.

“Motosserras abrem clareiras, tribos cercadas pelo
garimpo.
Extração ilegal de madeira, tá limpo!
Um benefício à beira do precipício.
Atitude na latitude, entre games e bolas de gude.
Sabe desde o início: alma, corpo, espírito e mente
Sua jornada diligente faz valer o sacrifício
É isso...”

ForFun

“Foco, força e fé, já falou meu irmão
Meninos mimados não podem reger a nação
Meninos mimados não podem reger a nação”
Criolo

Agradecimentos

Ao Prof^o Dr. Vinícius de Avelar São-Pedro pela confiança e orientação em todo processo do mestrado.

Ao Prof^o Dr. Guilherme Becker por toda confiança depositada a mim para executar um projeto tão grande e especial. Agradeço também por toda orientação e paciência em todas as etapas deste projeto.

Ao Prof^o Dr. Célio F. Haddad, por todo suporte técnico e de materiais durante os campos.

Ao meu amor, Ingrid Scheeffler, por tudo que fez e faz por mim todos os dias! A sua ajuda foi fundamental para este projeto, em campo, laboratório, escrita e na vida.

A toda minha família, Regina, Rick, Heidi, Carlos e Luiz Carlos, por acreditarem no meu trabalho e me incentivarem cada vez mais a seguir minha profissão.

Ao Movimento Escoteiro, que não estava no projeto, mas estava comigo em todos os momentos.

Aos grandes amigos que fiz, Diego Moura, Sasha Greenspan e Wesley Neely, que ofereceram uma imensa ajuda na parte laboratorial deste trabalho, além da diversão proporcionada pela sua companhia em terras estrangeiras.

À família Becker: Gui, Mônica, Samuel e Lila e família Greenspan: Joel e Allison pela hospitalidade e carinho em suas residências durante a fase tão importante das análises em laboratório.

A Mariana Lyra, Paula Prist e Jean Paul Walter Metzger pelo suporte e ajuda fundamental para calcular as métricas de paisagem e extração em laboratório.

Aos amigos e amigas Emily Guimarães, Ibrahim Nehemy, João Mendes, Rayna Bell e Roberta Mariáh minha enorme gratidão por acompanhar e auxiliar em campo, algo fundamental para realização deste trabalho.

Aos meus amigos Sóstenes Pelegrini e André Assalim pela força de sempre na herpetologia e na vida.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela bolsa de Mestrado concedida além de se preocupar e ocupar um papel importantíssimo na conservação da fauna silvestre.

À Universidade do Alabama pela confiança e financiamento do projeto (Startup Funds #3263), os quais foram fundamentais e únicos para o desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP Rio Claro, pelo suporte técnico, de materiais e estrutura laboratorial para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos - UFSCar pela confiança depositada a mim e à equipe para execução do projeto.

A todos os professores do Programa PPGCFau pela dedicação e ensinamentos durante as disciplinas.

Aos gestores e funcionários do Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual Intervales e Serra do Japi, por possibilitar os estudos nos parques, e todo apoio e infraestrutura oferecida a mim e toda equipe.

A todos os proprietários que permitiram acesso às suas propriedades para a execução deste projeto.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Instituto Chico Mendes - SISBIO e ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético pelas licenças concedidas para realização deste trabalho. IBAMA: processo nº 260108 – 005.880/2018; SISBIO: processo nº 63917-3; SISGEN, processo nº A663126.

RESUMO

A desconexão de habitats pode ser definida como a descontinuidade entre habitats usados por diferentes estágios da história de vida de uma espécie. As principais espécies afetadas são as que necessitam migrar entre habitats distintos para completar o ciclo reprodutivo, como boa parte das espécies de anfíbios. Grande parte do declínio das populações de anfíbios no mundo e no Brasil tem base na disseminação do fungo quitrídio aquático *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Embora já se saiba que a desconexão de habitats está ligada a um maior risco de extinção de anfíbios, um possível efeito da perda de conectividade a nível de paisagem aumentando o risco de quitridiomicose precisa ser investigado. Sabe-se também que a microbiota cutânea simbiote (o microbioma) é a primeira linha de defesas dos anfíbios contra patógenos invasores como o *Bd*. Desta forma, um distúrbio no microbioma cutâneo causado pelo desmatamento e fragmentação de habitats poderia reduzir as defesas dos anfíbios hospedeiros contra *Bd* em paisagens altamente fragmentadas. Este estudo tem como objetivo testar o efeito do desmatamento e da desconexão de habitats na dinâmica patógeno-hospedeiro em anfíbios, investigando também, as relações entre a diversidade e a composição do microbioma cutâneo dos anfíbios com a fragmentação florestal. Nossos resultados sustentam a hipótese de que, quanto menor o fragmento e mais desconectado de corpos d'água permanentes, maior a prevalência e a carga de infecção de *Bd* nas populações de anfíbios, principalmente em anfíbios com fase larval aquática que conduzem migrações reprodutivas durante o período chuvoso. Nossos resultados também indicam que elevada riqueza bacteriana do microbioma está correlacionada com um menor risco de quitridiomicose. Estratégias de restauração das matas ciliares podem reduzir o risco de quitridiomicose e contribuir na conservação dos anfíbios da Mata Atlântica.

Palavras-chave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, Fragmentação de habitat, Microbiota, “*habitat split*”,

ABSTRACT

Habitat split can be defined as the human-induced discontinuity between habitats used by different stages of the life history of a species. The main affected species are those that need to migrate between distinct habitats to complete their reproductive cycle, as most amphibians species. Much of the ongoing amphibian declines around the world, including Brazil, are based on the emergence of the waterborne chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Although it is already known that habitat split is linked to an increased risk of local amphibian declines and extinctions, little is known how habitat split at the landscape scale increases the risk of chytridiomycosis. It is also known that the symbiotic cutaneous microbiota (the microbiome) is the first line of amphibians defenses against invasive pathogens such as *Bd*. Thus, disturbance in the cutaneous microbiome caused by deforestation and habitat fragmentation could reduce host defenses against *Bd* in highly fragmented landscapes. This study aims to test the effect of deforestation and habitat split on host-pathogen dynamics in amphibians, also investigating the relations between the amphibian microbiome diversity, composition, and habitat disturbances. Our results support the hypothesis that, the smaller the fragment and the more disconnected from permanent water bodies, the greater the *Bd* prevalence and infection loads in amphibian populations, regardless of amphibian reproductive strategy or migratory behavior. In addition, we found that high bacterial richness in the host skin microbiome is correlated with low *Bd* infections. Our findings highlight that efforts to restore natural riparian vegetation could reduce the risk of chytridiomycosis and contribute to the conservation of amphibians in the Atlantic Forest.

Key-words: Chytridiomycosis, Microbiome, *Batrachochytrium dendrobatidis*, habitat split

INTRODUÇÃO

Uma das fronteiras da ecologia de doenças é entender como as mudanças antropogênicas de habitat e a fragmentação da paisagem afetam os vertebrados e como eles respondem a doenças (Fahrig et al. 2019; Becker et al. 2017). A perda e a fragmentação de habitats são as maiores ameaças para a biodiversidade do planeta (Corlett, 2000). Aliadas a isso, doenças emergentes também reduzem diretamente a capacidade das paisagens de manter a biodiversidade (Daszak et al. 2000). Para muitas espécies de vertebrados que vivem em paisagens antropizadas, nem todos os habitats necessários estão presentes ou conectados, e essas espécies dependem da complementação da paisagem, permitindo a movimentação através de diferentes habitats, para completar seu ciclo de vida (Pope et al. 2000). Embora a fragmentação do habitat nem sempre leve a reduções na biodiversidade, a descontinuidade da paisagem afeta os padrões de movimento dos indivíduos, com possíveis efeitos na exposição a patógenos e resistência adquirida (Fahrig et al. 2019; Becker et al. 2007).

Sabe-se que a redução da diversidade de espécies é uma das possíveis consequências da fragmentação de habitat, podendo levar a um forte aumento de densidade das espécies generalistas remanescentes (Peterka, 2008). A redução da diversidade combinada com o aumento da densidade de espécies generalistas está muitas vezes ligada a um maior risco de doenças (Ostfeld et al., 2002; Allan et al., 2003). Uma revisão recente mostra que a perda da diversidade tende a aumentar o risco de doenças através de vários mecanismos sob o guarda-chuva do efeito de diluição (Civitello et al. 2015). Sabe-se pouco, contudo, sobre o efeito da diversidade da microbiota cutânea sobre o risco de doenças e de como essa diversidade é afetada pela fragmentação.

Os anfíbios são um modelo ideal para testar como os distúrbios antropogênicos do hábitat moldam as respostas do hospedeiro à doença. Muitas espécies fazem curtas migrações anuais para ambientes aquáticos, o que influencia as taxas de exposição a patógenos transmitidos pela água, como o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Este patógeno cutâneo - extremamente generalista entre os anfíbios, infectando pelo menos 700 espécies - está ligado ao declínio e extinção de populações desses animais, sendo, portanto, ideal para estudos da dinâmica de doenças infecciosas (Woodhams et al. 2008, Lips 2016, Scheele et al. 2019).

Nas paisagens em que os ambientes terrestres e aquáticos estão naturalmente conectados, os anfíbios podem acessar mais frequentemente os corpos d'água. Isto poderia aumentar as defesas do hospedeiro contra o fungo *Bd*, que é transmitido pela água (Ramsey

et al. 2010, McMahon et al. 2014), ao ativar o sistema imunológico adaptativo com infecções repetidas de baixa carga, permitindo emergir uma resistência (ou tolerância) adquirida. Por outro lado, em paisagens fragmentadas, o uso da terra geralmente leva à separação espacial entre as manchas de vegetação, utilizadas como refúgio, e os ambientes reprodutivos aquáticos, como lagoas e riachos (Becker et al. 2007). Encontros limitados com corpos d'água durante os meses não reprodutivos impedem as populações de anfíbios de exposições frequentes ao *Bd*, que podem não adquirir resistência adaptativa para lidar com infecções esporádicas pelo fungo e tolerância geral ao hospedeiro durante a estação anual de reprodução. Distúrbios na composição e diversidade do microbioma cutâneo ligados aos distúrbios ambientais também podem influenciar significativamente no risco de quitridiomicose, visto que estudos recentes apontam para efeitos inibitórios de várias bactérias no crescimento de *Bd* (Piovia-Scott et al. 2015, Bletz et al. 2013, Woodhams, 2015). Embora já se saiba que a desconexão de habitats está ligada a extinção de anfíbios (Becker et al. 2007; Becker et al. 2010), as interações entre distúrbios na paisagem, a diversidade da microbiota cutânea e o risco de quitridiomicose ainda precisam ser investigadas.

Este estudo tem como objetivo testar o efeito da desconexão de habitats (*habitat split*) na dinâmica patógeno-hospedeiro em anfíbios. A nossa hipótese é que, em paisagens preservadas e com baixa desconexão de habitats, os anfíbios cruzem por drenagens e outros reservatórios naturais de *Bd* durante o ano todo, gerando fortes respostas adaptativas nos anfíbios e um menor risco de quitridiomicose durante o período reprodutivo. Ao contrário, em paisagens com altos níveis de desconexão de habitats, espera-se que anfíbios tenham uma baixa exposição ao fungo *Bd* durante a maior parte do ano (fim do verão, outono e inverno) e não apresentem defesas adquiridas contra *Bd* no início do período reprodutivo. Esperamos encontrar um maior efeito da desconexão de habitats em espécies de anfíbios com desenvolvimento larval aquático do que espécies com desenvolvimento direto em ambiente terrestre, já que espécies terrestres podem completar o ciclo de vida em fragmentos isolados. O presente trabalho também tem o objetivo de investigar relações entre a diversidade e composição do microbioma cutâneo dos anfíbios com a fragmentação florestal, a desconexão de habitats e a infecção por *Bd*. A nossa hipótese é que a maior diversidade do microbioma cutâneo pode estar relacionada com um menor risco de infecção por *Bd*. A perda e fragmentação de habitat também podem reduzir a diversidade do microbioma, reduzindo a chance de ocorrência de bactérias capazes de inibir o crescimento de *Bd*. Estes objetivos, combinados, irão gerar informações até então inexistentes sobre a dinâmica patógeno-hospedeiro em anfíbios ao longo de paisagens com diferentes níveis de degradação,

contribuindo assim com a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

a. Área de estudo e desenho amostral

O estudo foi realizado em oito diferentes paisagens da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, em um gradiente de desmatamento que varia de 13,55% a 81,32%. Com a finalidade de controlar os efeitos geoclimáticos nas nossas análises, nossas paisagens foram selecionadas com base na alta similaridade em relação a (i) latitude, (ii) sazonalidade da pluviosidade e (iii) topografia e altitude. As oito paisagens estão inseridas em Unidades de Conservação e propriedades particulares nas localidades de: Bananal (22° 47' S 44° 21' W), Parque Estadual Intervales (24° 16' S 48° 21' W), Serra do Japi (23° 14' S 46° 58' W), Cotia (23° 42' S 47° 05' W), Parque Estadual da Serra do Mar (23° 20' S 45° 08' W), Pilar do Sul (floresta contínua) (23° 54' S 47° 41' W), Ribeirão Branco (24° 09' S 48° 42' W) e São Luiz do Paraitinga (23° 13' S 45° 19' W) (**Figura 1**).

Obtivemos dados hidrológicos e de cobertura vegetal da Fundação Brasileira Para o Desenvolvimento Sustentável para as paisagens estudadas, incluindo dados espaciais (5 x 5 m de resolução) gerados usando imagens RapidEye em uma escala de 1:10,000 Fundação Brasileira Para o Desenvolvimento Sustentável (2020). Dados de uso e cobertura da terra (*land use/land cover* - LULC) delineiam áreas de agricultura, áreas urbanas, floresta natural, silvicultura e rede de drenagens incluindo riachos, lagos e banhados. Extraímos duas métricas a nível de paisagem (15 km de diâmetro), duas métricas em escala local (250 m de raio ao redor de cada ponto amostrado), e três métricas sem escala. Dentre as sete métricas extraídas, definimos vegetação natural como o percentual de floresta natural dentro de um círculo de 15 km de diâmetro. Medimos a distância entre o centróide de cada fragmento de vegetação natural e o centróide do fragmento vizinho (Euclidean Nearest Neighbor Distance - ENDD); quanto mais próximo de zero, maior é a agregação entre fragmentos na paisagem. A nível local extraímos o percentual de drenagens em cobertura vegetal natural e a densidade de borda (comprimento de borda em metros dividido pela área da paisagem, multiplicado por 10.000 para conversão a hectares). Finalmente, extraímos uma métrica de desconexão de habitats e uma métrica descrevendo a área do fragmento/local amostrado. Definimos desconexão de habitats como a distância média entre a borda de cada fragmento florestal e a

rede de drenagens mais próxima em direção aos quatro pontos cardeais. Todas as métricas foram calculadas utilizando a plataforma ARCGIS 10.1 (ESRI, 2011).

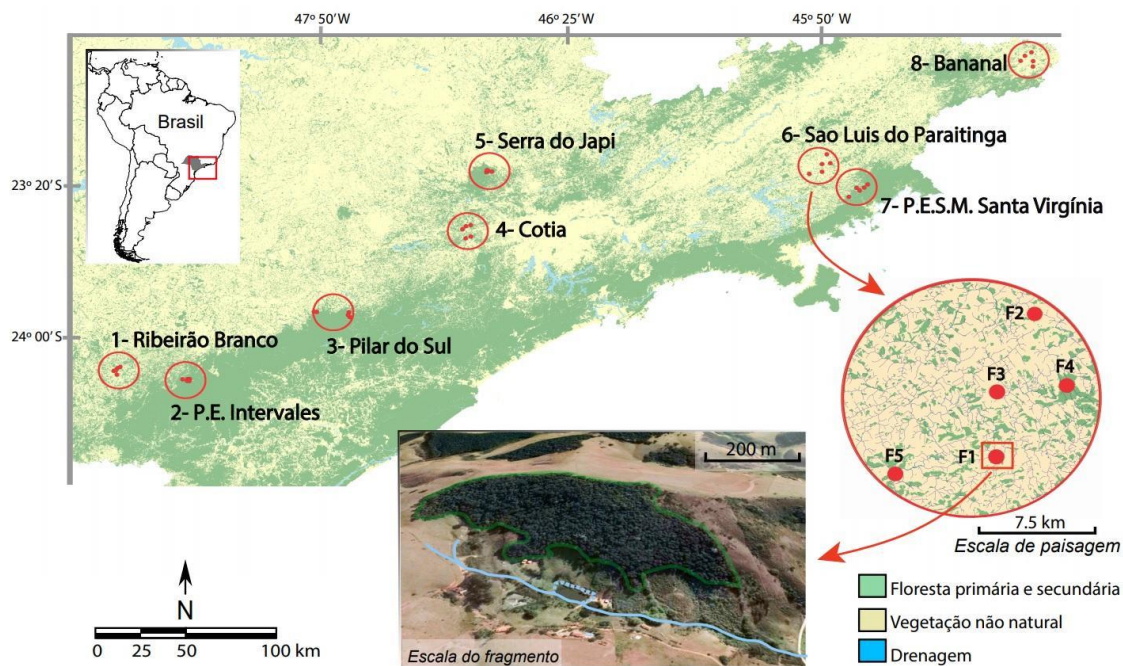


Figura 1. Oito paisagens focais (pequenos pontos vermelhos) de Mata Atlântica no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Números indicam cada área amostral: 1 – Ribeirão Branco, 2 – Parque Estadual Intervales, 3 – Pilar do Sul, 4 – Cotia, 5 – Serra do Japi, 6 – São Luís do Paraitinga, 7 – Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia e 8 – Bananal. O círculo vermelho grande (escala de 7,5 Km) exemplifica fragmentos amostrados em cada paisagem. O polígono verde representa um dos fragmentos florestais desconectado do habitat aquático (linha azul: drenagem; linha tracejada: lago associado a drenagem; linha verde: fragmento).

Foram definidos cinco pontos amostrais por paisagem, totalizando 40 pontos amostrais (para as oito paisagens) em fragmentos de vegetação natural ou em floresta primária contínua. As amostragens de campo ocorreram ao longo da estação chuvosa durante duas campanhas entre os períodos de 21 de setembro a 6 de novembro de 2018 (primeira campanha amostrou somente o ambiente terrestre) e 10 de dezembro de 2018 a 29 de janeiro de 2019 (segunda campanha amostrou ambos os ambientes terrestres e aquáticos, incluindo ambientes aquáticos adjacentes aos fragmentos florestais nas áreas fragmentadas). Com o intuito de reduzir os potenciais efeitos da sazonalidade e variabilidade climática, em cada campanha todos os 40 pontos amostrais foram visitados. A ordem espacial das amostragens foi feita de forma aleatória a fim de reduzir ainda mais o efeito da variação espaço-temporal na amostragem.

b. Espécies estudadas

Amostramos seis espécies de anfíbios, selecionadas com base nos seguintes critérios: (i) espécies associadas ao ambiente florestal, (ii) com período de reprodução dependente da estação chuvosa (novembro à fevereiro), (iii) com diferentes modos reprodutivos e necessidades de migração (quatro espécies que necessitam de migrações reprodutivas e duas espécies que não precisam migrar para reproduzir). Deste modo, quatro possuem a fase larval aquática: *Boana faber*, *Bokermannohyla circumdata*, *Bokermannohyla hylax* (Hylidae) e *Rhinella ornata* (Bufonidae) e duas possuem desenvolvimento direto no ambiente terrestre: *Haddadus binotatus* (Craugastoridae) e *Ischnocnema henselii* (Brachycephalidae) (Figura 2). A espécie *B. faber* tem tamanho mediano, atingindo cerca de 9 cm (macho e fêmea). A espécie se refugia em áreas de mata e migra na época reprodutiva para ambientes aquáticos lânticos como lagos, lagoas e brejos (Haddad et al., 2008). Frequentemente os machos constroem ninhos com formato circular onde as fêmeas fazem a desova e ocorre o desenvolvimento dos girinos, até eles migrarem para o corpo d'água mais próximo e futuramente, quando atingirem a forma de imago ou jovem, e migrarem para a floresta (Izecksohn & Carvalho-e-Silva, 2001; Lima et al., 2013). *Bokermannohyla circumdata* e *Bk. hylax* são duas espécies de tamanho médio, variando de 5,3 cm a 6,6 cm e de hábito florestal cujos girinos exotróficos que se desenvolvem em água corrente ou parada (Haddad et al., 2013). *R. ornata* possui o tamanho mediano (machos: 6,4 cm e fêmeas: 7,9 cm), habita florestas e comumente migra para áreas abertas (lagos, brejos, lagoas e rios) para a sua reprodução (Haddad et al., 2013). Por fim *I. henselii* e *H. binotatus*, apresentam machos com tamanho pequeno (2,3 cm e 3,9 cm, respectivamente) e as fêmeas atingem um tamanho mediano com cerca de 3,6 cm e 5,7 cm, respectivamente. Diferente das espécies citadas anteriormente, *I. henselii* e *H. binotatus* não deixam a floresta para reprodução e dependem diretamente de um solo úmido e com serrapilheira abundante, uma vez que sua reprodução é com desenvolvimento direto de ovos terrestres (Haddad et al., 2013). Todas as espécies são consideradas endêmicas da Mata Atlântica (Haddad et al., 2013).

Capturamos 903 indivíduos: *B. faber* (n= 356), *I. henselii* (n= 204), *H. binotatus* (n= 126), *R. ornata* (n= 112), *B. hylax* (n= 63), *B. circumdata* (n= 42), média de 67,25 + 16,81 s.d. anfíbios por paisagem dentro do fragmento (campanha 1); média de 45,63 + 18,91 s.d. anfíbios por paisagem incluindo corpos d'água (campanha 2). Lavamos os indivíduos com água destilada no campo e obtivemos amostras da epiderme do hospedeiro através da

passagem de cotonetes estéreis (*swab*) cinco vezes nos membros anteriores e posteriores de cada indivíduo, especificamente entre os dígitos, e em cada lado na região inguinal (Hyatt *et al.*, 2007). Armazenamos cada *swab* em criotubos estéreis de 1,5 ml. Após a obtenção das amostras, todos os indivíduos foram soltos no mesmo local da coleta, não havendo qualquer tipo de marcação ou sacrifício dos animais.

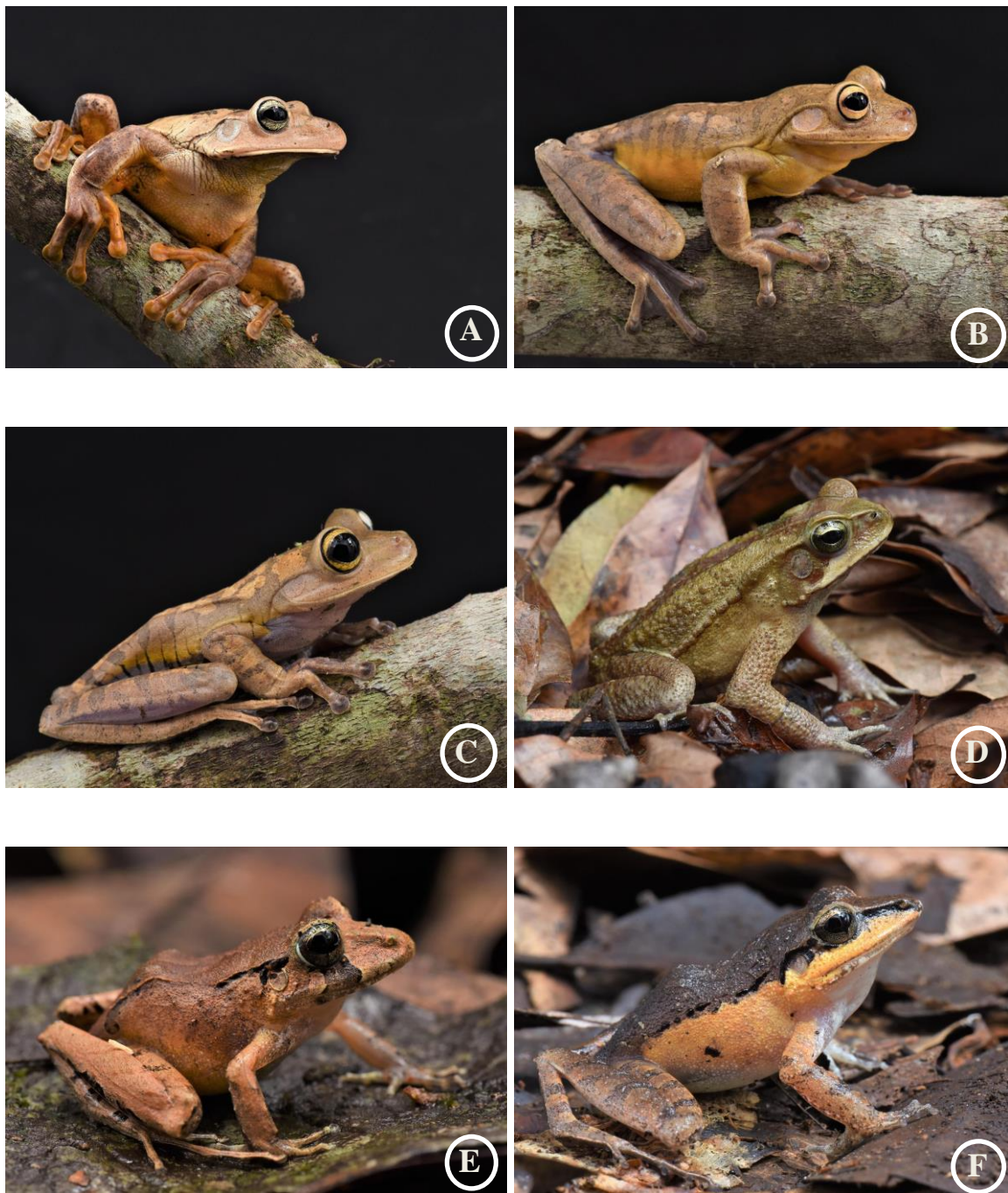


Figura 2: Espécies amostradas no estudo: (A) perereca-gladiadora - *Boana faber*; (B) perereca-de-coxa-anelada - *Bokermannohyla circumdata*; (C) perereca-de-coxa-anelada - *Bokermannohyla hylax*; (D) sapo-cururuzinho - *Rhinella ornata*; (E) sapo-de-folhíço - *Ischnocnema henselii*; (F) sapo-de-folhíço - *Haddadus binotatus*.

c. Patógeno aquático

Batrachochytrium dendrobatidis (*Bd*) é um fungo microscópico que causa quitridiomiose nos anfíbios. O *Bd* é responsável por causar declínios e extinções recentes de populações em várias ecorregiões, incluindo a Mata Atlântica brasileira (Lips et al. 2006, Crawford et al. 2010, Becker e Zamudio 2011, Catenazzi e Von May de 2014, Lips 2016, Carvalho et al. 2017). O estágio de vida infeccioso de *Bd* é um zoósporo flagelado que pode nadar em corpos d'água (Longcore et al. 1999, Berger et al. 2005, Raffel et al. 2015) e ataca a pele queratinizada úmida de anfíbios e peças bucais pós-metamórficas de larvas (Longcore et al. 1999, Berger et al. 2005). No hospedeiro, o fungo se desenvolve como um zoosporângio estacionário, que eventualmente descarrega uma nova geração de zoósporos na pele, causando reinfecção do mesmo indivíduo ou transmissão a outros hospedeiros anfíbios (Berger et al. 2005, Briggs et al. 2010). Os zoósporos também são descarregados em corpos d'água e, portanto, os habitats aquáticos podem servir como reservatórios de *Bd* no ambiente. Características do ecossistema nos declínios de anfíbios relacionados ao *Bd* incluem mudanças na estrutura da comunidade de algas, produção primária e na dinâmica predatória e de insetos aquáticos (Whiles et al. 2006), levando à mudanças na estabilidade do ecossistema.

d. Quantificação do microbioma bacteriano cutâneo

Em cada amostra de *swab*, o DNA foi extraído utilizando kits Qiagen DNeasy. Estas extrações foram diluídas a uma concentração de 1:10 para as análises de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) utilizando padrões sintéticos variando de 0,1 a 1.000 cópias ITS (*internal transcribed spacer*) para a quantificação de *Bd* conforme procedimentos descritos por Boyle *et al.*, (2004). Utilizando o mesmo DNA extraído para análise dos microbiomas bacterianos, segundo protocolo de “Earth Microbiome Project” (Caporaso *et al.*, 2010; Caporaso *et al.*, 2012). Para tal, amplificamos através de PCR a região V4 do gene de rRNA 16S, utilizando os primers 515F e 806R. Construimos duas bibliotecas, as quais foram sequenciadas por Illumina MiSeq (2250 bp). As sequências foram utilizadas para criação de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) de forma a limitar o conjunto de dados apenas às amostras bacterianas, utilizando QIIME II (Quantitative Insights into Microbial Ecology v. 1.4.0). Tratamos a variável número de OTUs como riqueza de bactérias nas nossas análises e interpretações. Também computamos a riqueza do microbioma núcleo (*core microbiome*)

identificando as OTUs compartilhadas por mais de 90% dos indivíduos amostrados para cada espécie.

e. Análises estatísticas

Utilizamos análise de variância (ANOVA) para comparar a prevalência média (binomial, com link logit) e cargas de infecções por *Bd* (Zero-inflated negative binomial - ZINB) entre as espécies estudadas. Utilizamos Modelos Linear Generalizados - GLMs para testar o efeito das sete variáveis bióticas e abióticas, incluindo paisagem amostrada e campanha, para explicar a prevalência do *Bd* nos anfíbios amostrados. Conduzimos testes semelhantes para analisar as cargas de infecção de *Bd* utilizando modelos binomiais negativos inflacionados de zeros (ZINB). Utilizamos um procedimento de seleção de modelos baseado em critério de informação de Akaike (AICc) e reportamos o modelo mais parcimonioso (menor valor de AICc) para cada seleção de modelos empregada. Especificamente, testamos o efeito destas variáveis explanatórias (i) sobre prevalência (GLM binomial, com link logit), (ii) sobre as carga de infecção média de *Bd* (ZINB) e (iii) sobre ambas composição (primeiro eixo de PCoA baseado em uma matriz “weighted unifrac distance”) e diversidade das comunidades de bactérias cutâneas (número de OTUs) nos anfíbios amostrados (GLM normal, com log link). Também rodamos um modelo GLM testando se o número de OTUs varia entre espécies, incluindo paisagem como variável fixa no modelo e utilizando um teste *a posteriori* de Tukey para comparar o número médio de OTUs por espécies. Para detectar possível autocorrelação espacial nos modelos mencionados, calculamos um teste de Mantel baseado em 5.000 permutações, usando as distâncias euclidianas entre as 40 paisagens (medidas a partir do centróide de cada paisagem), e os resíduos mencionados nos melhores modelos. Nós também testamos resíduos de modelo para autocorrelação espacial calculando o *Moran's I*. Para essas análises, usamos a matriz de pesos de distância inversa, usando o centróide das coordenadas de cada um dos 40 pontos de amostragem. Esse teste é comumente usado e aceito como uma avaliação justa da autocorrelação de dependência espacial (Fortin et al. 2002). Tanto para o teste de Mantel quanto para o teste de *Moran's I*, os resultados mostraram uma autocorrelação espacial não significativa (teste Mantel, $p > 0.05$; *Moran's I*, $p > 0.05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas em R (R CORE TEAM, 2016).

Resultados

Descrição da prevalência e cargas de infecção de *Bd* nas espécies estudadas

A prevalência média de *Bd* (15,17 %) variou significativamente entre espécies ($\chi^2 = 103.476$, $n = 903$, $P < 0.0001$; Figura 3A). A carga de infecção média (1,513 cópias ITS) também variou significativamente entre as espécies (Wald- $\chi^2 = 56.999$, d.f. = 5, $P < 0.0001$; Figura 3B). Para as espécies de fase larval aquática observamos: *B. faber* - prevalência (13,76 %) e carga de infecção (1,494 cópias ITS); *R. ornata* - prevalência (5,36 %) e carga de infecção (1,063 cópias ITS); *B. hylax* - prevalência (12,70 %) e carga de infecção (1,724 cópias ITS); *B. circumdata* - prevalência (7,14 %) e carga de infecção (2,312 cópias ITS), enquanto que, para as espécies de desenvolvimento direto: *I. henselii* - prevalência (34,80 %) e carga de infecção (1,507 cópias ITS); *H. binotatus* - prevalência (0 %); carga de infecção (0 cópias ITS).

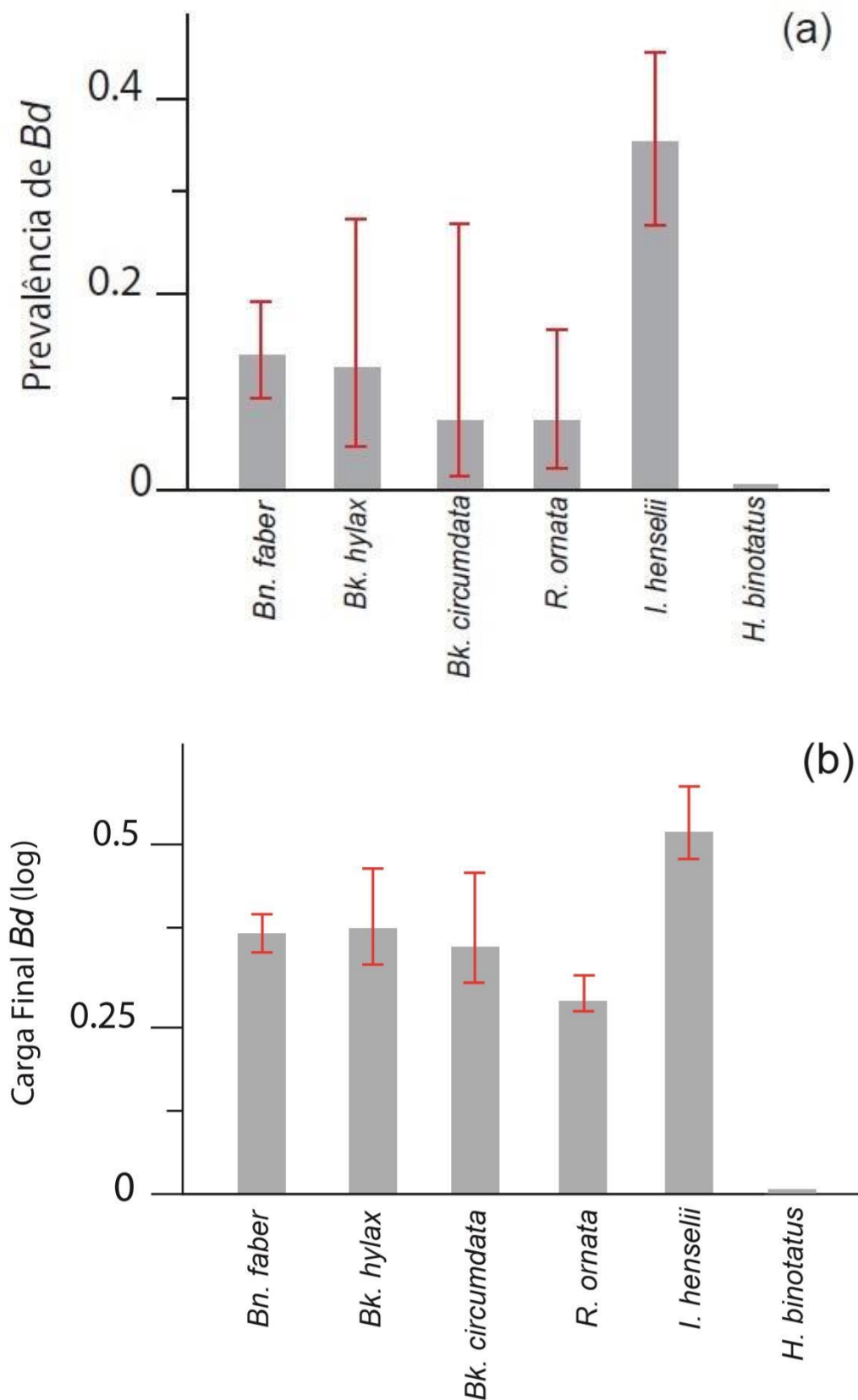


Figura 3. (a) Prevalência do *Bd* e (b) carga de infecção média final do *Bd* nas seis espécies amostradas em oito fragmentos da Mata Atlântica no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. As barras delimitam o valor do registro e as linhas vermelhas representam o intervalo de confiança de 95%.

Efeito da cobertura vegetal, fragmentação e desconexão de habitats na prevalência e nas cargas de infecção por *Bd* nos anfíbios.

Nosso GLM mais parcimonioso explicando a prevalência de *Bd* nas seis espécies estudadas - controlando por modo de desenvolvimento (aquático vs. terrestre) e paisagem amostral como variáveis fixas - detectou uma maior prevalência em paisagens com maior cobertura vegetal natural ($\chi^2 = 102.690$, d.f. = 6, $P < 0.0001$). Este modelo também indicou que a prevalência é maior em fragmentos pequenos e fragmentos com maiores taxas de desconexão de habitats, independentemente do modo reprodutivo das espécies de anfíbios (Tabela 1; Figura 4). O modelo ZINB mais parcimonioso também apontou para um efeito significativo da desconexão de habitats aumentando as cargas de infecção por *Bd* (Wald $\chi^2 = 28.789$, $\beta = 0.016$, $P < 0.0001$).

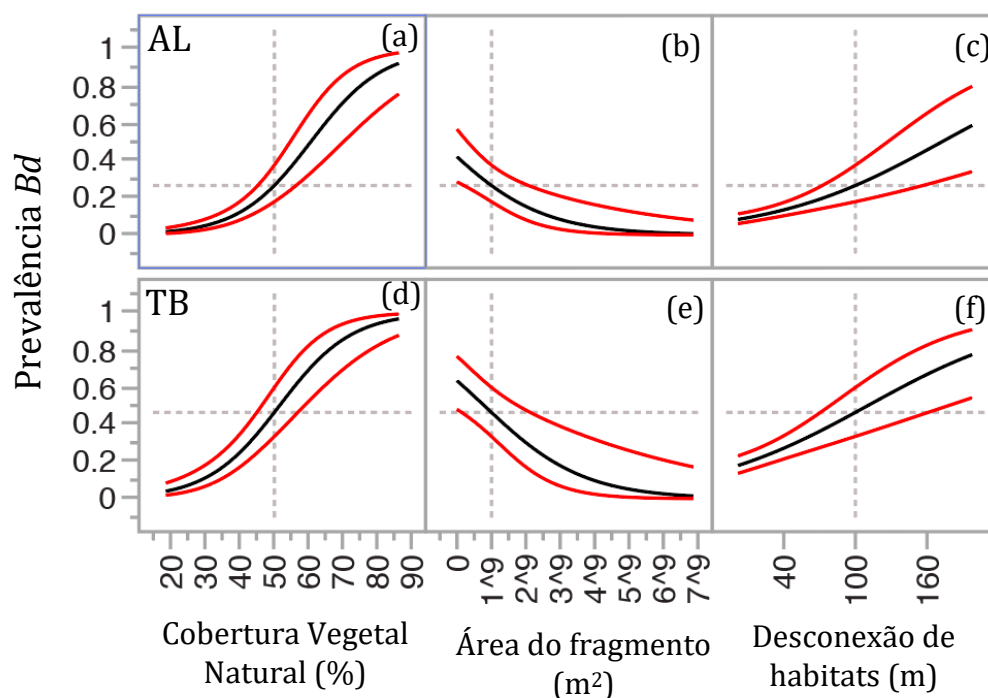


Figura 4. Efeito da cobertura vegetal natural (a, d), fragmentação (b, e) e desconexão de habitats (c, f) na prevalência de *Bd* nos anfíbios de fase larval aquática (AL) e desenvolvimento direto (TB).

Tabela 1. GLM binomial testando simultaneamente os efeitos de variáveis da paisagem e modo de desenvolvimento na prevalência de *Bd* em populações de anfíbios em diferentes paisagens do Estado de São Paulo - SP, Brasil.

Variável	Beta	Erro padrão	χ^2	P
Intercept	-7.068	0.762	141.644	<.0001
% Cobertura Vegetal	0.106	0.015	67.394	<.0001
Tamanho do fragmento (m ²)	-0.001	0.001	29.108	<.0001
Desconexão de habitat	0.012	0.004	9.286	0.002
Tam. do fragmento * Desconexão de habitat	0.001	0.001	4.777	0.029
Campanha de campo [segunda campanha]	0.694	0.224	9.864	0.002
Modo de desenvolvimento [larva aquática]	-0.578	0.111	27.983	<.0001

Estatística do modelo: $\chi^2=102.690$; D.f. = 6; $P<0.0001$; AICc = 680.203

Retirando o tamanho do fragmento do modelo para reduzir correlação cruzada com outras variáveis manteve um forte efeito de habitat split predizendo alta prevalência de *Bd*.

Incluindo espécies como variável fixa também manteve o efeito positivo da desconexão de habitat no risco de infecção.

Desconexão de habitats vs. microbioma bacteriano cutâneo

Detectamos um efeito significativo da desconexão de habitats e da interação entre desconexão de habitats e cobertura vegetal natural sobre a composição das bactérias cutâneas nos anfíbios amostrados ($F_{[12,653]} = 3.628$, $P < 0.0001$; Tabela 2). Rodamos a mesma seleção de modelos incluindo as mesmas métricas espaciais para explicar a riqueza de bactérias (número de OTUs) mas esta relação não foi significativa em nenhum dos modelos explicando prevalência e cargas de infecção de *Bd*. Também não encontramos uma associação entre a composição ou riqueza das bactérias com a prevalência ou carga de infecção de *Bd*. Contudo, encontramos uma maior riqueza de bactérias na única espécie livre de *Bd* (*H. binotatus*), quando comparado com as demais espécies ($F_{[5, 501.7]} = 55.100$, $P < 0.0001$) (Figura 5). Além disto, a riqueza do microbioma núcleo de *H. binotatus* (n= 12 OTUs) foi quatro vezes maior do que aquele da segunda espécie mais diversa: *R. ornata* (n= 3 OTUs). As outras espécies apresentaram um microbioma núcleo variando de 0 a 3 OTUs: *B. faber* (n= 0); *Bk. hylax* (n= 2); *Bk. circumdata* (n= 1) e *I. henselii* (n=1) (Tabela 3).

Tabela 2. GLM explicando a composição bacteriana cutânea dos anfíbios amostrados (PCaA, eixo I, weighted unifrac distance).

Variável	Beta	Erro padrão	<i>t</i>	P
Intercept	-0.121	1.585	-0.08	0.939
Modo de desenvolvimento [AL]	-0.005	0.007	-0.68	0.499
Tamanho do fragmento (m ²)	0.001	0.001	0.09	0.928
Desconexão de habitats	-0.001	0.001	-3.72	0.0002*
Tam. frag. *Desconexão de habitats	-0.001	0.001	-2.69	0.0074*
Campanha	-0.010	0.015	-0.68	0.497

* Área amostral: N parâmetros=7, F=3.602, P<0.001)

Tabela 3. Diversidade do Microbioma núcleo (OTUs detectados em >90% dos indivíduos amostrados) encontrado nas seis espécies amostradas em oito fragmentos da Mata Atlântica no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil.

Microbioma Núcleo	
Boana faber	
Nenhum	
Bokermannohyla hylax	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Alcaligenaceae	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae	
Bokermannohyla circumdata	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Alcaligenaceae	
Rhinella ornata	
k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Sphingobacteriaceae; g__s__	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Rhizobiaceae; g__Agrobacterium; s__	
Ischnocnema henselii	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae	
Hadaddus binotatus	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Rhizobiaceae; g__Agrobacterium; s__	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Hyphomicrobiaceae; g__Devosia; s__	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Rhizobiaceae; g__Rhizobium; s__	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhodobacterales; f__Rhodobacteraceae; g__Paracoccus; s__marcusii	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Xanthomonadales; f__Xanthomonadaceae	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Hyphomicrobiaceae; g__Devosia; s__	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Rhizobiaceae; g__Agrobacterium; s__	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Bradyrhizobiaceae; g__Bosea; s__genosp.	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Sphingomonadales; f__Sphingomonadaceae; g__Novosphingobium	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Sphingomonadales; f__Sphingomonadaceae; g__Sphingomonas;	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhizobiales; f__Methylobacteriaceae; g__Methylobacterium	
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Caulobacteriales; f__Caulobacteraceae; g__Mycoplana; s__	

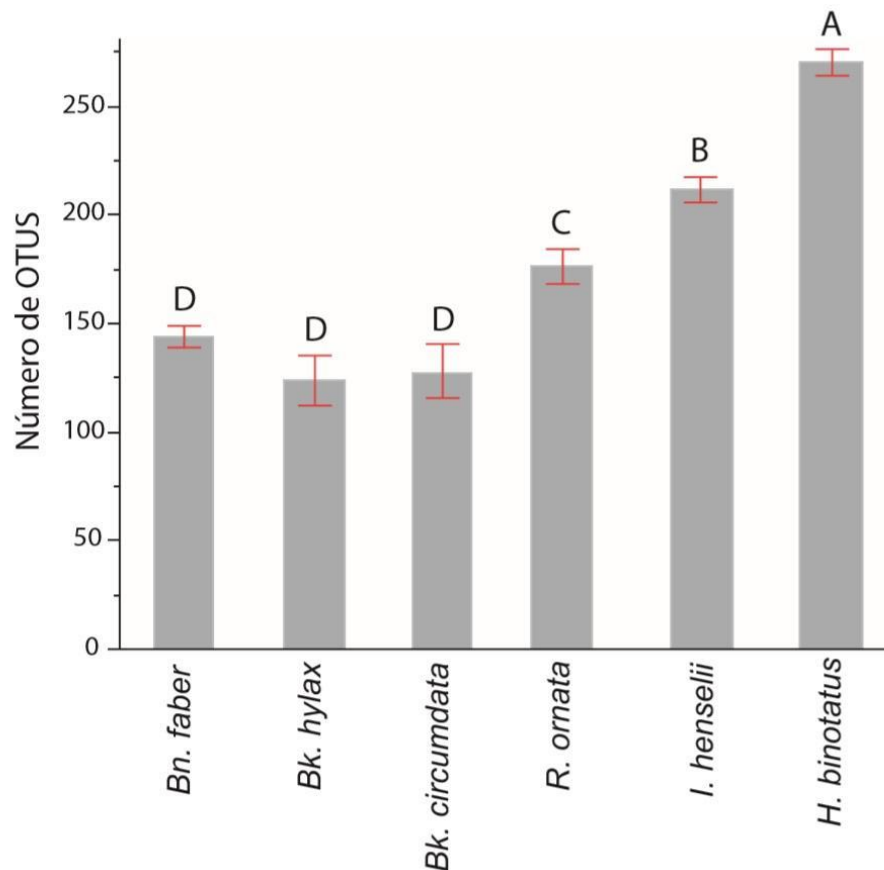


Figura 5. Riqueza de bactérias encontradas na pele das seis espécies amostradas em oito fragmentos da Mata Atlântica no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. As barras delimitam o valor do registro e as linhas vermelhas representam o intervalo de confiança. Letras (A, B, C e D) significam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste *a posteriori* de Tukey.

Discussão

Sabemos que a nível regional ou continental a perda de habitat e a infecção por *Bd* são duas das principais causas de declínio populacional e extinção de espécies em anfíbios tropicais (Wilson, 1992; Pounds et al. 2006; Cushman et al. 2006; Scheele et al. 2019). Como descrito anteriormente por Becker & Zamudio (2011) há uma maior prevalência de *Bd* em áreas de floresta do que em áreas abertas, possivelmente devido ao microclima mais úmido em áreas de mata ideais para o crescimento do fungo (Venesky et al. 2014; Becker et al. 2012). Apesar destes resultados indicarem que, a nível de paisagem, há um maior risco de quitridiomiose em áreas de florestas densas e contínuas do que em áreas fragmentadas, nosso estudo detectou uma maior prevalência e maiores cargas de infecção por *Bd* em anfíbios amostrados em fragmentos pequenos e desconectados de corpos d'água permanentes. Interessantemente, este padrão foi observado tanto em espécies que migram para reproduzir, quanto em espécies que conseguem completar seu ciclo de vida mesmo

dentro de fragmentos pequenos e desconectados de corpos d'água sem necessitar realizar migrações reprodutivas. Estes resultados dão suporte à nossa hipótese de que a desconexão de habitat pode estar diminuindo as defesas dos anfíbios contra o *Bd* e abrindo a porta para futuros estudos testando mecanismos específicos de como o desmatamento afeta as defesas inatas, adaptativas e do microbioma cutâneo, alterando a capacidade imunológica dos anfíbios.

Apesar de termos encontrado um efeito concreto da desconexão de habitats na composição do microbioma cutâneo, não encontramos correlação entre a desconexão de habitats e a riqueza de bactérias ou entre a riqueza de bactérias e *Bd*. Contudo, um estudo recente analisando 20 populações de anfíbios na Mata Atlântica apontou para uma redução da riqueza bacteriana cutânea em áreas desmatadas em comparação com as de floresta contínua (Becker et al. 2017). Isto indica que a redução da diversidade do microbioma e o aumento do risco de doenças poderia ser um mecanismo explicando as extinções locais observadas em paisagens fragmentadas no estado de São Paulo (Becker et al. 2007). Dando suporte para esta hipótese, encontramos uma maior riqueza do microbioma núcleo na única espécie onde *Bd* não foi detectado (*H. binotatus*), mesmo com um alto número de indivíduos testados, sugerindo um potencial efeito protetor da diversidade do microbioma.

Dados recentes indicam que membros do microbioma são capazes de produzir peptídeos antifúngicos capazes de inibir o crescimento de *Bd* na pele dos anfíbios (Bletz et al. 2013, Woodhams et al. 2007)). Uma vertente crescente da literatura vincula simbioses microbianas em hospedeiros à defesas imunológicas na vida selvagem. Sabe-se que a microbiota simbiótica e seus produtos metabólicos inativam alguns patógenos inerentes da vida selvagem (Woodhams et al. 2007, 2014, 2018, 2019, Harris et al. 2009). As infecções às vezes levam a desequilíbrios do microbioma, fenômeno este conhecido como disbiose (Petersen e Round 2014; Singh et al. 2018, Rosado et al. 2019), e doenças. Mas, interações microbianas competitivas associadas às respostas do hospedeiro podem resultar em microbiomas enriquecidos com membros antipatogênicos. Após a recuperação da infecção, essas comunidades microbianas enriquecidas são preparadas para uma segunda exposição e, como as células de memória imune, são capazes de se proliferar rapidamente em resposta à exposição a patógenos (Jin Song et al. 2019). Esse enriquecimento, denominado memória de microbioma, pode levar a mudanças adaptativas no microbioma do hospedeiro, com subsequente recuperação deste. O desenvolvimento da memória de microbioma requer exposição a baixas cargas de patógenos, mas a interrupção da conectividade da paisagem através da mudança antropogênica do habitat pode restringir o movimento do hospedeiro e

as possibilidades de encontro com patógenos e simbiontes benéficos. Assim, essa barreira à resistência microbiana adquirida merece atenção como um mecanismo subjacente a aumentos frequentemente observados no risco de doenças em animais silvestres em paisagens fragmentadas. Apesar de termos encontrado uma relação entre a alta riqueza do microbioma núcleo e uma menor probabilidade de infecção, dados de função do microbioma são muito complexos e estudos futuros são necessários para obter informações de potencial inibitório e facilitador das bactérias em relação ao *Bd* a partir de cultura de bactérias e ensaios “challenge” em laboratório.

Outro potencial mecanismo que poderia ajudar a explicar o padrão encontrado de maior infecção em áreas com fragmentos pequenos e desconectados de corpos d’água permanentes é a erosão genética. Áreas fragmentadas tendem a abrigar populações de anfíbios com menor diversidade genética (Dixo et al., 2009; Fahring 2003; Johansson et al., 2007). A baixa diversidade imunogenética (MHC) tem sido ligada à reduzidas cargas de infecções e prevalência de *Bd* (Savage et al. 2018; Elison et al. 2014). Populações em paisagens com alta desconexão de habitats, além de apresentarem baixa diversidade imunogenética, também podem apresentar um atraso na transcrição de genes do complexo MHC quando expostos ao *Bd* depois de passarem o inverno em fragmentos secos. A fragmentação também deve afetar hormônios de estresse como Corticosterona, potencialmente alterando as defesas inatas e a habilidade dos anfíbios fazerem o balanço hídrico quando infectados por *Bd* (Navas et al., 2016).

A dinâmica de quitridiomycose e as respostas imunológicas dos anfíbios hospedeiros podem também operar de forma distinta a nível de paisagem e de fragmento. Sabe-se que padrões bióticos e abióticos são perceptíveis de formas diferentes em escalas geográficas distintas (Cohen et al. 2016), e que a história de vida do hospedeiro exerce um papel importante na resistência ao *Bd* (Mesquita et al. 2017). Concordando com estes estudos, as espécies *Bn. faber*, *Bk. hylax* e *Bk. circumdata* ficaram muito próximas tanto em prevalência quanto em carga de infecção por *Bd*, possivelmente devido às histórias de vida similares (todas arborícolas). Contudo, podemos destacar os desafios e impactos que sofrem as espécies com histórias de vida distintas. Espécies com modos reprodutivos diferentes (aquáticos vs. terrestres), possuem riscos e inúmeros obstáculos a serem superados. Uma espécie de hábito terrestre e principalmente com desenvolvimento direto, dificilmente sairá dos domínios florestais, pois não possui a clara necessidade de uma migração ou exposição para a sua reprodução, uma vez que o seu nicho ecológico se resume a ambientes sombreados, com serapilheira abundante e úmida (Becker et al. 2007; Becker et al. 2010). Enquanto isso,

muitas espécies que possuem a fase larval aquática podem se ver obrigadas a se deslocar sazonalmente para áreas abertas para poder se reproduzir. E com o aumento da escala na desconexão das paisagens para os corpos d'água, problemas como distância, direção, predadores, baixa umidade, agrotóxicos e altas temperaturas podem causar um efeito forte e significativo no *Bd* e na interação entre *Bd*, microbioma e a fisiologia do hospedeiro.

Apesar de não termos encontrado *Bd* em *Haddadus binotatus*, uma espécie de desenvolvimento direto e que habita a serapilheira, outra espécie com características semelhantes (*Ischnocnema henselii*) mostrou os maiores valores de prevalência e carga de infecção média. Embora as duas espécies ocupem nichos ecológicos semelhantes, é realmente intrigante o porquê de apresentarem padrões de infecção tão distintos. É possível que *I. henselii* possa agir como um reservatório alternativo de *Bd* em ambientes mais secos ou períodos de estresse hídrico. Indivíduos de *I. henselii* possivelmente se agrupam em manchas de solo mais úmidos, criando um cenário de alta transmissão de *Bd* (a transmissão poderia ser direta ou através do ambiente: solo, bromélia ou poças temporárias). Ambos *I. henselii* e *H. binotatus* possuem as mesmas chances de exposição, mas apresentam contrastantes taxas de infecção e diversidade do microbioma núcleo. Nosso próximo passo será tentar isolar as bactérias do microbioma núcleo *H. binotatus* a fim de testar e identificar potenciais probióticos na pele desta espécie.

Ocupando aproximadamente 7% da superfície terrestre e possuindo mais da metade das espécies biológicas, as florestas tropicais vêm sofrendo uma ascensão de degradação (Myers, 1997), e estão entre os ambientes mais afetados pela fragmentação (Myers, 1984). Dentre as florestas tropicais, a Mata Atlântica é uma das mais ameaçadas do mundo (Mittermeier *et al.*, 2005; Myers *et al.*, 2000), e a dinâmica da cobertura da terra e seus reflexos sobre os recursos naturais estão intimamente relacionadas ao histórico de ocupação da paisagem pelo homem (Massoca, 2010) e a configuração espacial dos remanescentes de vegetação natural e os corpos d'água. Nossa pesquisa aponta, pela primeira vez, para uma relação concreta entre o desmatamento, a desconexão de habitats e infecção por um dos patógenos mais importantes para a conservação da biodiversidade tropical. No entanto, os mecanismos que ligam a desconexão de habitats, o microbioma cutâneo e o *Bd* parecem ser mais complexos do que o previsto. Além disso, nossa pesquisa abre portas para estudos futuros testando o efeito da restauração da conectividade entre habitats naturais distintos e a restauração da capacidade imunológica de espécies de vertebrados endêmicos. Nossos resultados intrigantes clamam por estudos que testem mecanismos ligando a desconexão de habitats ao microbioma. Sugerimos a realização de estudos experimentais a fim de identificar

mecanismos ligados à resistência dos anfíbios hospedeiros em paisagens com diferentes históricos de fragmentação. Resultados destas pesquisas poderão gerar estratégias de restauração florestal a fim de maximizar respostas adaptativas de invertebrados e vertebrados (e.g., odonata, coleoptera, díptera, aves migratórias, mamíferos aquáticos, etc) a patógenos emergentes.

Referências

- Allan, B. F., Keesing, F., and Ostfeld, R. S. 2003. Effect Of forest fragmentation on Lyme disease. *Conservation Biology*, v. 17, n. 1, p. 267-274.
- Andersen, M., Thornhill, A. and Koopowitz, H. 1997. Tropical forest disruption and stochastic biodiversity losses. In: W.F. Laurance, & R.O. Bierregaard, Jr., (eds.). *Tropical forest remnants: ecological, management, and conservation of fragmented communities*. The University of Chicago Press. Chicago
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F., and Prado, P. I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, vol. 318, Issue 5857, pp. 1775-1777.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, and P. I. Prado. 2010. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. *Conservation Biology* 24:287–294.
- Becker, C. G. and Zamudio K. R. 2011. Tropical Amphibian Populations Experience Higher Disease Risk in Natural Habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118: 9893-9898.
- Becker, C. G., Rodriguez, D., Longo, A. V., Talaba, A. L., Zamudio, K. R. 2012. Disease Risk in Temperate Amphibian Populations Is Higher at Closed-Canopy Sites. *Plos One*, v. 7, p. e48205.
- Becker, C. G., A. V. Longo, C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio. 2017. Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284:20170582.
- Berger, L., A. D. Hyatt, R. Speare, and J. E. Longcore. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:51–63.
- Bletz, M. C., A. H. Loudon, M. H. Becker, S. C. Bell, D. C. Woodhams, P. C. Minbiole, K, and R. N. Harris. 2013. Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecology Letters* 16:807–820
- Boyle, D. G., D. B. Boyle, V. Olsen, J. A. T. Morgan, and A. D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:141–148
- Briggs, C. J., R. A. Knapp, and V. T. Vredenburg. 2010. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9695–9700.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, R. Sarah, M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith and

- N. Knight. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. doi:10.1038/ismej.2012.8
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Knight, R., N. Fierer, A. G. Pena, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, Scott, T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld and R. Knight .2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303 *Nature Methods*, 2010; doi: 10.1038 / nmeth.f.303
- Carvalho, T., C. G. Becker, and L. F. Toledo. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284:20162254.
- Catenazzi, A., and R. von May. 2014. Conservation status of amphibians in Peru. *Herpetological Monographs* 28:1–23.
- Civitello, D. J., Cohen, J., Fatima, H., Halstead, N. T., Liriano, J., McMahon, T. A. 2015. Biodiversity inhibits parasites: broad evidence for the dilution *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (28), 8667-8671
- Crawford, A. J., K. R. Lips, and E. Bermingham. 2010. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:13777–13782.
- Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128(2), 231–240. doi: 10.1016/j.biocon.2005.09.031 Fortin MJ, Dale MRT, Hoef JV (2002) Spatial analysis in ecology. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester; Vol 4; pp 2051±2058
- Corlett, R. T. 2000. Environmental heterogeneity and species survival in degraded tropical landscapes. In: M.J. Hutchings, E.A. John & A.J.A. Stewart (eds.). *The ecological consequences of environmental heterogeneity*. pp. 333-355. British Ecological Society, Londres.
- Daszak, P., A. A. Cunningham, and A. D. Hyatt. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443–449.
- Dixo, M., Metzger, J. P., Morgante, J. S and Zamudio, K. R. 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biol Conserv* 142: 1560–1569.
- Ellison, A., Tunstall, T., DiRenzo, G.V., Hughey, M.C., Rebolgar, E., Belden, L.K., Harris, R.N., Ibanez, R., Lips, K.R and Zamudio, K.R. 2014. More than Skin Deep: Functional Genomic Basis for Resistance to Amphibian Chytridiomycosis. *Genome Biol Evol* 7:286–298.

- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 34: 487–515.
- Fahrig, L., Arroyo-Rodríguez, V., Bennett, J. R., Boucher-Lalonde, V., Cazetta, E., Currie, D. J., Eigenbrod, F., Ford, A. T., Harrison, S. P., Jaeger, J. A. G., Koper, N., Martin, A. E., Martin, J. L., Metzger, J. P., Morrison, P., Rhodes, J. R., Saunders, D. A., Simberloff, D., Smith, A. C., Tischendorf, L., Vellend, M., Watling, J. I. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biol Conserv* 230:179–186.
- Fundação Brasileira Para o Desenvolvimento Sustentável. 2020. Disponível em: https://www.fBds.org.br/article.php3?id_article=594
- Haddad, C. F. B., Toledo, L. F. and Prado, C. P. A. 2008. Anfíbios da Mata Atlântica. São Paulo: Editora Neotropica.
- Haddad, C. F. B., Toledo, L. T., Prado, C. R. A., Loebmann, D. and Gasparini J.L. 2013 Guia de Anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia. São Paulo, Anolis Books.
- Hyatt, A. D., D. B. G. D. Boyle, V. Olsen, D. B. G. D. Boyle, L. Berger, D. Obendorf, A. Dalton, K. Kriger, M. Hero, H. Hines, R. Phillott, R. Campbell, G. Marantelli, F. Gleason, and A. Colling. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 73:175–192
- IUCN 2019. IUCN Red List of threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>.
- Izecksohn, E., Carvalho-e-Silva, S. P. 2001. Anfíbios do Município do Rio de Janeiro. ed. UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. 136 p.
- Jin, S., S., D. C. Woodhams, C. Martino, C. Allaband, A. Mu, S. Javorschi-Miller-Montgomery, J. S. Suchodolski, and R. Knight. 2019. Engineering the microbiome for animal health and conservation. *Experimental Biology and Medicine* 244:494–504.
- Johansson, M., Primmer, C. R. and Merila J. (2007). Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Mol Ecol* 16: 2693–2700.
- Lima, M. S. C. S, Pederassi, J. and Souza, C. A. S. 2013. Aspectos ecológicos da reprodução de *Hypsiboas faber* (Anura, Hylidae) na enseada de Sítio Forte, Ilha Grande, Angra dos Reis, Brasil. *Comunicata Scientiae* 4(2):195-202.
- Lips, K., F. Brem, R. Brenes, and J. Reeve. 2006. Infectious disease and global biodiversity loss: pathogens and enigmatic amphibian extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3165–3170.
- Lips, K. R. 2016. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Phil Trans R Soc Lond* 371:20150465.

- Longcore, J. E. E., A. P. P. Pessier, and D. K. K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227.
- Massoca, P. E. S. 2010. Ocupação humana e reflexos sobre a cobertura florestal em um assentamento rural na Amazônia Central / Paulo Eduardo dos Santos Massoca. Manaus: [s.n.] ix, 76 f.: il. color.
- McMahon, T. A., B. F. Sears, M. D. Venesky, S. M. Bessler, J. M. Brown, K. Deutsch, N. T. Halstead, G. Lentz, N. Tenouri, S. Young, D. J. Civitello, N. Ortega, J. S. Fites, L. K. Reinert, L. A. Rollins-Smith, T. R. Raffel, and J. R. Rohr. 2014. Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature* 511:224–227.
- Mesquita, A. F. C. C., C. Lambertini, M. Lyra, L. R. Malagoli, T. Y. James, L. F. Toledo, C. F. B. B. Haddad, and C. G. Becker. 2017. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. *Scientific Reports* 7:16605.
- Mittermeier, R. A., Robles, G., P., and Hoffman M. 2005. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. University of Chicago Press, 392 p.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. a. B., and Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 153–158.
- Myers, N. 1984. *The primary source: Tropical forests and our future*. W.W. Norton, New York.
- Navas, C. A., Gomes, F. R., and De Domenico, E. A. 2016. Physiological ecology and conservation of anuran amphibians. *Amphibian and Reptile Adaptations to the Environment: Interplay Between Physiology and Behavior*. DV de Andrade, CR Bevier, and JE de Carvalho (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 155-188.
- Ostfeld, R. S., Keesing, F., Shauber, E. M. and Schimidt, K. 2002. A. Ecological context of lyme disease biodiversity, habitat fragmentation and risk of infection. In: Aguirre, A. A. R. S.; Tabor, G. M.; House, C.; Pearl, M. C. *Conservation medicine: ecological health in practice*. New York: Oxford University Press, 407 p.
- Peterka, C. R. L. 2008. Avaliação do efeito da fragmentação florestal na diversidade de carrapatos e patógenos transmitidos por carrapatos na região do Pontal Parapanema, SP. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.
- Petersen, C., and J. L. Round. 2014. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology* 16:1024–1033.
- Piovia-Scott, J., Pope, K., Worth, S. J., Rosenblum, E. B., Poorten, Thomas.; Refsnider, J., Rollins-Smith, L. A., Reinert, L.K., Wells, H.L., Reimanek, D., Lawler, S. and Foley,

- J. 2015. Correlates of virulence in a frog-killing fungal pathogen: evidence from a California amphibian decline. *The ISME Journal*.V.9. 1570-1578.
- Pope, S.E., Fahrig, L., and Merriam, H.G. 2000. Landscape complementation and metapopulation effects on leopard frog populations. *Ecology* 81:2498–2508.
- Pounds, J. A., M. R. Bustamante, L. A. Coloma, J. A. Consuegra, M. P. L. Fogden, P. N. Foster, E. La Marca, K. L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S. R. Ron, G. A. Sánchez-Azofeifa, C. J. Still, and B. E. Young. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161–167.
- Raffel, T. R., N. T. Halstead, T. A. McMahon, A. K. Davis, and J. R. Rohr. 2015. Temperature variability and moisture synergistically interact to exacerbate an epizootic disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282:20142039.
- Ramsey, J. P., L. K. Reinert, L. K. Harper, D. C. Woodhams, and L. A. Rollins-Smith. 2010. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity* 78:3981–3992.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rosado, P. M., D. C. A. Leite, G. A. S. Duarte, R. M. Chaloub, G. Jospin, U. Nunes da Rocha, J. P. Saraiva, F. Dini-Andreote, J. A. Eisen, D. G. Bourne, and R. S. Peixoto. 2019. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. *ISME Journal* 13:921–936.
- Savage, A.E., Mulder, K.P., Torres, T. and Wells, S. 2018. Lost but not forgotten: MHC genotypes predict overwinter survival despite depauperate MHC diversity in a declining frog. *Conserv Genet* 19:309–322.
- Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo - SMA. 2014. Lista da fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo. TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira.
- Scheele, B. C., F. Pasmans, L. F. Skerratt, L. Berger, A. Martel, W. Beukema, A. A. Acevedo, P. A. Burrowes, T. Carvalho, A. Catenazzi, I. De la Riva, M. C. Fisher, S. V. Flechas, C. N. Foster, P. Frias-Alvarez, T. W. J. Garner, B. Gratwicke, J. M. Guayasamin, M. Hirschfeld, J. E. Kolby, T. A. Kosch, E. La Marca, D. B. Lindenmayer, K. R. Lips, A. V. Longo, R. Maneyro, C. A. McDonald, J. R. Mendelson III, P. Palacios-Rodriguez, G. Parra-Olea, C. L. Richards-Zawacki, M. Rodel, S. M. Rovito, C. Soto-Azat, L. F. Toledo, J. Voyles, C. Weldon, S. M. Whitfield, M. Wilkinson, K. R. Zamudio, and S. Canessa. 2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science* 1463:1459–1463

- Singh, A., E. Lasek-Nesselquist, V. Chaturvedi, and S. Chaturvedi. 2018. *Trichoderma polysporum* selectively inhibits white-nose syndrome fungal pathogen *Pseudogymnoascus destructans* amidst soil microbes. *Microbiome* 6:1–11.
- Venesky MD, Liu X, Sauer EL, Rohr JR (2014) Linking manipulative experiments to field data to test the dilution effect. *J Anim Ecol* 83:557–565.
- Whiles, M. R., K. R. Lips, C. M. Pringle, S. S. Kilham, R. J. Bixby, R. Brenes, S. Connelly, J. C. Colon-Gaud, M. Hunte-Brown, A. D. Huryn, C. Montgomery, and S. Peterson. 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4:27–34.
- Wilson, E. O. 1992. *The Diversity of Life* (W. W. Norton & Company, New York).
- Woodhams D. C., Alford, R. A., Antwis, R. E., Archer, H., Becker, M. H., Belden, L. K., Bell, S. C., Bletz, M., Daskin, J. H., Davis, L. R., Flechas, S. V., Lauer, A., Gonzalez, A., Harris, R. N., Holden, W. M., Hughey, M. C., Ibanez, R., Knight, R., Kueneman, J., Rabemananjara, F., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L.A., Roman-Rodriguez, F., Shaw, S. D.; Walke, J. B. and McKenzie, V. 2015. Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens. *Ecology* 96: 595–595.
- Woodhams, D. C., H. Brandt, S. Baumgartner, J. Kielgast, E. Küpfer, U. Tobler, L. R. Davis, B. R. Schmidt, C. Bel, S. Hodel, R. Knight, and V. McKenzie. 2014. Interacting symbionts and immunity in the amphibian skin mucosome predict disease risk and probiotic effectiveness. *PLoS ONE* 9: e96375.
- Woodhams, D. C., B. C. LaBumbard, K. L. Barnhart, M. H. Becker, M. C. Bletz, L. A. Escobar, S. V. Flechas, M. E. Forman, A. A. Iannetta, M. D. Joyce, F. Rabemananjara, B. Gratwicke, M. Vences, and K. P. C. Minbiole. 2018. Prodigiosin, Violacein, and volatile organic compounds produced by widespread cutaneous bacteria of amphibians can inhibit two *Batrachochytrium* fungal pathogens. *Microbial Ecology* 75:1049–1062.
- Woodhams, D. C., L. A. Rollins-Smith, L. K. Reinert, B. A. Lam, R. N. Harris, C. J. Briggs, V. T. Vredenburg, B. T. Patel, R. M. Caprioli, P. Chaurand, P. Hunziker, and L. Bigler. 2019. Probiotics modulate a novel amphibian skin defense peptide that is antifungal and facilitates growth of antifungal bacteria. *Microbial Ecology*.
- Woodhams, D. C., V. T. Vredenburg, M. A. Simon, D. Billheimer, B. Shakhtour, Y. Shyr, C. J. Briggs, L. A. Rollins-Smith, and R. N. Harris. 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 138:390–398.
- Woodhams, D. C., V. L. Kilburn, L. K. Reinert, J. Voyles, D. Medina, R. Ibáñez, A. D. Hyatt, D. G. Boyle, J. D. Pask, and D. M. Green. 2008. Chytridiomycosis and amphibian population declines continue to spread eastward in Panama. *EcoHealth* 5:268–274.