

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO E ARTES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE ANUROS NO
PARQUE NATURAL MUNICIPAL AUGUSTO RUSCHI AVALIANDO A
PROVÁVEL OCORRÊNCIA DO FUNGO QUITRÍDIO

Nome do aluno: Matheus de Toledo Moroti

São José dos Campos/SP

2016

Universidade do Vale do Paraíba
Faculdade de Educação e Artes

Curso de Ciências Biológicas
da Faculdade de Educação e Artes

TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Título: Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi avaliando a provável ocorrência do fungo *Quitridio*

Aluno: Matheus de Toledo Moroti

Orientador: Cristina Pacheco Soares

Co-orientador: Iberê Farina Machado

Banca Examinadora:

Frederico Lencioni
Flávia Morais Villaça

Nota do Trabalho:

São José dos Campos – SP
2016

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

FACULDADE DE EDUCAÇÃO E ARTES

TRABALHO DE GRADUAÇÃO

TÍTULO

Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi avaliando a provável ocorrência do fungo Quitridio

ALUNO

MATHEUS DE TOLEDO MOROTI

Relatório Final apresentado como parte das exigências da disciplina Trabalho de Graduação a Banca Examinadora da Faculdade de Educação e Artes da Universidade do Vale do Paraíba

Orientador: Dra. Cristina Pacheco Soares
Co-orientador: Dr. Iberê Farina Machado

São José dos Campos – SP
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família (Val, Wilson, Cláudia e Ditinha) por sempre me apoiarem e me ajudarem desde o início na conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Agradeço a minha orientadora Dra. Cristina Pacheco Soares por todo esse tempo que estive em seu laboratório pela paciência e por todo auxílio nas análises moleculares do fungo, e principalmente por ter sido além de uma professora, uma mãe. Agradeço também a ONG Instituto Boitató (Projeto Amplexo) e ao Prof. Dr. Iberê Farina Machado, meu co-orientador, pelo auxílio na divulgação da pesquisa e pelas correções no trabalho.

A minha namorada, amiga e companheira Mariana Pedrozo pelo auxílio nas análises estatísticas e pelas sugestões fundamentais na produção deste trabalho. Agradeço aos meus amigos Jonatas Alves Ferreira Neto, Andriele Cristina e Rodrigo Dela Rosa de Sousa por toda ajuda nos trabalhos de campo. Sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço muito ao colega Daniel José de Andrade do Planejamento Urbano do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP pela elaboração dos mapas de calor deste trabalho. A Secretaria de Meio Ambiente (SEMEA) de São José dos Campos e ao SISBio por concederem as devidas licenças que possibilitaram esta pesquisa.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC e o auxílio financeiro nesta pesquisa.

RESUMO

Das 7.529 espécies de anfíbios do planeta, 1.080 espécies são conhecidas para o Brasil, sendo 1.039 da Ordem Anura. Esse número expressivo de riqueza de espécies coloca o Brasil como o país que abriga a maior diversidade de anfíbios do mundo. No entanto, em termos de perda de biodiversidade, os anfíbios são considerados atualmente a classe de vertebrados mais ameaçados do planeta, e um dos fatores apontados como causador dessa perda é a infecção causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Com isso, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a riqueza de espécies de anuros determinando a sua distribuição espacial e sua sazonalidade, verificando a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. A área de estudo compreende o Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, em São José dos Campos, estado de São Paulo. As amostragens foram realizadas de agosto de 2015 a julho de 2016. Foram utilizadas três diferentes metodologias para o encontro dos anuros e a técnica de PCR para detecção da presença do *Bd*. Foram registradas 33 espécies de anuros distribuídas em 19 gêneros, pertencentes a nove famílias. A curva do coletor sugere que novas visitas a campo raramente acrescentarão espécies à lista do PNMAR. Em relação à distribuição espacial nos anuros, a área que apresentou a maior riqueza de espécies foi interior de mata, o que está relacionado à maior heterogeneidade ambiental, que permite as espécies segregarem uniformemente no ambiente, diferente dos ambientes de área aberta e borda de mata que apresentam menor estratificação vertical e são menos estáveis em relação aos distúrbios e variações climáticas. As análises de quais fatores influenciaram a riqueza de anuros, mostraram que houve associação positiva entre todos os fatores abióticos (temperatura média, máxima, mínima e pluviosidade), porém apenas a temperatura média ($p=0,053$, $r_s= 0,32$) e máxima mensal ($p=0,005$, $r_s= 0,56$), apresentaram resultados significativos ($p<0.05$). Foram analisadas as 101 amostras e todas apresentaram resultados negativos para a presença de *Bd*. Devido aos resultados negativos encontrados nas análises moleculares das amostras coletadas, não foi possível traçar um padrão de contaminação de acordo com os modos reprodutivos. Todavia este resultado apresenta mais uma área que se encontra livre da infecção causada pelo fungo. Os resultados aqui apresentados podem ser utilizados para o manejo do PNMAR, a fim de criar estratégias de preservação dos diferentes habitats de reprodução, tanto aqueles inseridos em fragmentos florestais quanto aqueles encontrados em áreas abertas. Novos estudos devem ser direcionados a confirmar uma área que pode estar livre da infecção causada pelo fungo *Bd*.

Palavras – Chaves: anurofauna, ecologia, conservação, quitridiomycose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Distribuição espaço-temporal de anfíbios anuros	4
2.2	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	5
3	OBJETIVOS	8
3.1	Objetivo geral.....	8
3.2	Objetivos específicos	8
4	MATERIAIS E MÉTODOS	9
4.1	Área de estudo.....	9
4.2	Metodologia de campo.....	11
4.3	Metodologia de coleta de amostra biológica.....	12
4.4	Identificação molecular do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	13
4.5	Análise estatística.....	15
5	RESULTADOS.....	16
5.1	Riqueza, Ocorrência e Diversidade.....	16
5.2	Distribuição espacial	21
5.3	Distribuição temporal.....	38
5.4	Análise molecular do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	41
6	DISCUSSÃO	43
6.1	Riqueza, Ocorrência e Diversidade.....	43
6.2	Distribuição espacial	44
6.3	Distribuição temporal.....	45
6.4	Análise molecular do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	46
7	CONCLUSÃO	49
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O nome “anfíbio” provém do grego (amphi = duplo; bio = vida) e se deve ao fato de que grande parte das espécies apresentam duas fases de vida: uma fase larval aquática (girino), onde apresentam respiração branquial e a maioria possui alimentação a base de detritos de plantas; e a outra fase, a terrestre, onde o adulto possui respiração pulmonar e cutânea, onde a maioria das espécies são estritamente carnívoras (BERNARDE, 2012). Os anfíbios são extremamente dependentes das características do habitat em que vivem e um dos fatores correlacionados a essa característica é por possuírem a pele permeável (WELLS, 2007), e diferentes modos reprodutivos que apresentam uma especificidade a diferentes micros ambientes (HADDAD et al., 2013).

Os anuros são fundamentais na cadeia trófica dos ecossistemas (DUELLMAN; TRUEB, 1994), pois fazem parte da dieta de uma grande variedade de predadores, estando presentes na dieta de todas as classes de vertebrados e de alguns invertebrados (TOLEDO; RIBEIRO; HADDAD, 2007). Apesar de apresentarem em sua dieta principalmente invertebrados, os anuros podem se tornar presas desses animais, dependendo do tamanho e da relação presa-predador (TOLEDO; RIBEIRO; HADDAD, 2007), o que ressalta a importância da conservação desses animais para o equilíbrio do ecossistema.

Das 7.529 espécies de anfíbios do planeta (FROST, 2016), 1.080 espécies são conhecidas para o Brasil, sendo 1.039 pertencentes a Ordem Anura (SBH, 2016). Esse número expressivo de riqueza de espécies coloca o Brasil como o país que abriga a maior diversidade de anfíbios do mundo (SBH, 2016). Para o estado de São Paulo, que é um dos mais impactados pela ação antrópica, são conhecidos 31% do total de espécies descritas para o Brasil (ROSSA-FERES et al., 2008). O número de estudos envolvendo os anuros vem aumentando ao longo dos últimos anos e com auxílio de estudos moleculares, novas espécies e mudanças taxonômicas em algumas famílias vêm sendo propostas constantemente (DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016).

Em termos de perda de biodiversidade, os anfíbios são considerados atualmente a classe de vertebrados mais ameaçados do planeta, com mamíferos e aves ocupando a segunda e terceira posição respectivamente (STUART et al., 2004; KILPATRICK; BRIGGS; DASZAK, 2009). Diversos fatores como fragmentação e perda de habitat, presença de contaminantes químicos ou orgânicos nos ambientes, aumento da radiação UV-B, aquecimento global, mudanças climáticas e introdução de espécies exóticas são apontadas

como as causas dessa ameaça (YOUNG et al. 2001, 2004; STUART et al., 2004). As alterações climáticas afetam diretamente os anfíbios, pois alteram as condições ambientais e reduzem os habitats para reprodução, além de favorecer a presença de espécies exóticas (ÁVILA; FERREIRA 2004).

A destruição dos habitats vem sendo apontada como principal causa de perda em número de espécies e embora seja difícil encontrar ambientes que não tenham sofrido ação antrópica, algumas comunidades de anfíbios estão em declínio mesmo onde a fragmentação ambiental não é ostensiva (BLAUSTEIN et al., 2005). Ao lado da destruição de ambientes, a ação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), vem sendo apontada como uma das principais causas de declínio de espécies de anfíbios nos cinco continentes (BERGER et al., 1998; DASZAK et al., 1999; BOSCH; MARTÍNEZ-SOLANO; GARCÍA-PARÍS, 2001; SKERRATT et al., 2007; FISHER; WALKER; GARNER 2009).

O *Bd* é causador de quitridiomiose, uma doença que afeta fundamentalmente a parte cutânea dos anfíbios (SKERRAT et al., 2007). O zoósporo, fase infectante, do *Bd* é aquático e realiza uma colonização eficaz em seus hospedeiros tanto em estágio larval (girinos) quanto em adultos (GREENSPAN et al. 2012). A maior parte das espécies de anfíbios anuros da Mata Atlântica possui parte de sua atividade reprodutiva dependente de corpos d'água (HADDAD et al. 2013); e durante as atividades de acasalamento, o contato direto entre adultos, ou ainda, seus comportamentos agregativos podem favorecer a transmissão e contaminação pelo *Bd* (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004). A disseminação do fungo *Bd*, tem despertado o interesse de vários pesquisadores e agências de fomento, devido a sua agressividade e dispersão nos ambientes de Mata Atlântica.

Este trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento sobre a presença e distribuição do fungo *Bd* em um fragmento isolado e conservado da Mata Atlântica, assim como fornecer informações para o melhor conhecimento da dispersão do fungo e sua relação com a composição da anurofauna e seus comportamentos. A caracterização da partilha espacial e temporal permitirá a compreensão da organização das taxocenoses de anfíbios em um fragmento da Unidade de Conservação de Proteção Integral (UCPI) Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (PNMAR) e verificar se existe um padrão existente de contaminação por *Bd*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distribuição espaço-temporal de anfíbios anuros

A Mata Atlântica possui uma grande variação latitudinal, climática, geológica e ambiental, o que ocasiona uma ocupação e a grande diversidade de espécies (MORELLATO; HADDAD, 2000; TOLEDO et al., 2008). A heterogeneidade do habitat é apontada como um importante estruturador das comunidades de anuros (CARDOSO; ANDRADE; HADDAD, 1989; PARRIS, 2004; SILVA; CANDEIRA; ROSSA-FERES, 2012), pois nesses ambientes diversificados, é possível que mais espécies coexistam, em comparação a ambiente homogêneos (CONTE; ROSSA-FERES, 2007; SANTOS; ROSSA-FERES; CASATTI, 2007). A heterogeneidade é importante para os anuros, principalmente devido a diversidade de modos reprodutivos especializados, que exigem diferentes características do habitat e até diferentes substratos para empoleiramento e oviposição (HADDAD et al., 2013)

A importância do ambiente para os anuros já é conhecida (WELLS, 2007) e devido a isso, existem diferenças exigidas por cada espécie e que apresentam diferenças para cada região (ERNST; RÖDEL, 2008; VASCONCELOS et al., 2009). Identificar quais fatores influenciam os padrões de distribuição e abundância das espécies é importante para compreender quais são os requisitos mínimos para a manutenção das diferentes taxocenoses (MAGURRAN, 2011). As taxocenoses são reguladas tanto pelas interações ecológicas entre as espécies e sua história natural, quanto pela sua associação aos fatores bióticos e abióticos no habitat (ETEROVICK, 2003). A coexistência das espécies em uma taxocenose deve-se à utilização diferenciada dos recursos disponibilizados, de forma que não ocorra competição interespecífica direta, sendo a taxocenose organizada espacialmente ou temporalmente (CARDOSO; ANDRADE; HADDAD, 1989).

A partilha espacial ocorre, principalmente, em períodos reprodutivos, onde os anuros estabelecem diferentes estratégias para diminuir sua competição interespecífica (CARDOSO; ANDRADE; HADDAD, 1989; CONTE; ROSSA-FERES, 2007). A partilha se dá por meio da utilização de diferentes habitats e micro-habitat, como sítios de vocalização e desova, relacionados ao comportamento alimentar e/ou reprodutivo de cada espécie (DUELLMAN; TRUEB, 1994). As escolhas da distância da margem para vocalização ou altura do empoleiramento podem influenciar diretamente o distanciamento espacial entre as espécies garantindo uma maior ou menor partilha espacial (CARDOSO; ANDRADE; HADDAD, 1989; POMBAL Jr., 1997). Já a partilha temporal se dá por meio de características de

tolerância aos fatores abióticos, como variações de temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar, a variação dessas variáveis influencia os períodos de atividades e acabam segregando os anuros sazonalmente (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

O conhecimento da distribuição temporal e espacial dos organismos é importante para o entendimento de processos de inter-relação com o ambiente (BREWER, 1994). Esses mecanismos de isolamento reprodutivo primário são importantes para sucesso reprodutivo, até mesmo de espécies simpátricas (POMBAL Jr., 1997). Ao lado desses mecanismos, a partilha acústica se torna importante para que haja o reconhecimento das espécies, combinado a padrões espectrais e temporais do canto, como emissão de diferentes frequências, duração das notas entre outras características para redução da interferência acústica (DUELLMAN; PYLES, 1983; ROSSA-FERES; JIM, 2001; WOGEL; ABRUNHOSA; POMBAL Jr, 2002).

Diversos estudos buscam compreender a influência dos componentes do ambiente e como estes atuam na estruturação da comunidade de anuros (PARRIS, 2004; ERNST; RÖDEL, 2005; SANTOS; ROSSA-FERES; CASATTI, 2007; WERNER et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009; SILVA; CANDEIRA; ROSSA-FERES, 2012). Resultados diferentes são encontrados para cada região, sendo a divergência desses resultados atribuída as diferentes fitofisionomias encontradas e o clima de cada região (ERNST; RÖDEL, 2005), tamanho e isolamento do fragmento (EWERS; DIDHAM, 2008) e história natural das espécies no local de estudo (VASCONCELOS et al., 2009).

O encontro de espécies, com dados deficientes e registros novos de distribuição de espécies ainda pouco estudadas, em fragmentos isolados como o Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (PNMAR), em São José dos Campos, estado de São Paulo (MOROTI et al., 2016), mostra a importância de um fragmento florestal para conservação de anfíbios. Outras áreas com características similares ao PNMAR, tais como tamanho e localização perto de áreas urbanas, também revelaram abrigar novas espécies e uma riqueza considerável de anuros (SANTANA et al., 2008; SANTANA et al., 2012; MOROTI et al., 2016), destacando o papel dessas áreas na manutenção e capacidade de suporte para espécies endêmicas de Mata Atlântica.

2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis*

O declínio de anfíbios vem ocorrendo em diversos biomas mundiais, podendo afetar mais da metade das espécies de anfíbios conhecidas em todo mundo (YOUNG et al., 2001). Desde 1980, registros de declínios populacionais de anfíbios vêm sendo relatados para o

Brasil por diversas causas e em diferentes biomas, incluindo a Mata Atlântica (CARNAVAL et al., 2006; TOLEDO et al., 2006; JENKINSON et al., 2016). Entre as causas desse declínio estão doenças causadas por uma grande diversidade de agentes patogênicos como: vírus, bactérias, vermes parasitas, protozoários e fungos (CAREY, 1993; BERGER et al., 1998; JOHNSON et al., 1999; DASZAK et al., 1999; DASZAK et al., 2003). O fungo quitrídio, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), responsável por uma infecção cutânea denominada quitridiomicose é, atualmente, considerada um dos principais responsáveis declínio mundial de populações de anfíbios (SKERRATT, et al. 2007).

O *Bd* é um fungo intracelular que ataca as células queratinizadas da epiderme de seu hospedeiro (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999), causando desequilíbrio na fisiologia ativa da pele por meio da sua interferência nos processos de troca de água, gases e eletrólitos, assim como o efeito causado no sistema imune por meio da liberação de fatores tóxicos que inibem a proliferação de linfócitos no sistema de defesa do indivíduo infectado (VOYLES et al., 2009; FITES et al., 2013). Os primeiros registros da infecção causada pelo *Bd* ocorreram na Austrália e na América Central, tanto no meio natural quanto em cativeiro (BERGER et al., 1998; LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Nos últimos anos já é conhecida nos cinco continentes e tem sido relacionada com o declínio de diversas espécies de anfíbios (SKERRAT et al., 2007).

A fase infectante do *Bd* é aquática, representada pelo esporo flagelado denominado zoósporo (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999), que realiza uma colonização eficaz em seus hospedeiros tanto em estágio larval (girinos), quanto em adultos (GREENSPAN et al. 2012) devido à dependência da água para sua fase reprodutiva (HADDAD et al. 2013). Sua transmissão também pode ocorrer por meio do contato direto entre adultos durante acasalamento e por comportamentos agregativos (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004).

O *Bd* apresenta ampla distribuição pelo mundo e se mostra um patógeno generalista (OLSON et al., 2013). Possui uma ampla faixa de temperatura de crescimento, variando entre 4°C à 28°C e com seu ótimo variando entre 17°C e 23°C (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004). A quitridiomicose pode ser considerada a pior doença infecciosa entre vertebrados, devido ao número de espécies impactadas e sua propensão a levá-los a extinção (FISHER; GARNER, 2007), em sua maioria anuros, mas também membros das ordens gymnophiona e caudata (GOWER et al., 2012).

A dinâmica de infecção deste patógeno segue as linhagens geneticamente diferentes do *Bd* na natureza (FARRER et al., 2011; SCHLOEGEL et al., 2012) e sua variação fenotípica diretamente relacionada com taxas de infecção (BRANNELLY et al., 2015); bem como o comportamento, densidade e sistema imune dos hospedeiros (ROWLEY; ALFORD, 2007; RAMSEY et al., 2010), grau de desmatamento e cobertura de dossel (BECKER; ZAMUDIO, 2011) e sazonalidade de infecção pelo *Bd* em relação a diferentes regiões e espécies analisadas (LENKER et al., 2014; RUGGERI et al., 2015).

Em girinos a desqueratinização do aparelho bucal esta fortemente relacionada à quitridiomiose (TOLEDO et al., 2006). Em um estudo da Mata Atlântica, foram encontrados anuros em fase adulta mortos, aparentemente sem apresentarem nenhum sinal físico da infecção (CARNAVAL et al., 2006). Ruano-Fajardo, Toledo e Mott (2016), também relataram não terem observado nenhum sinal clínico na espécie *Phyllodytes edelmoi*, apesar das altas cargas de infecção detectadas, um resultado que vêm sido apontado constantemente em anuros de Mata Atlântica.

Além dos anfíbios como hospedeiros do *Bd*, são conhecidos atualmente outros vetores do patógeno na natureza. Brannelly et al. (2015) detectaram o *Bd* em lagostas, podendo estes atuarem como vetores da infecção para os anfíbios. Tanto as populações naturais quanto as de criação em cativeiro para fins comerciais foram detectadas transportando *Bd*, e que a carga de infecção foi sazonal e similar às encontradas nas comunidades de anfíbios, sendo maiores em temperaturas mais frias e menores em temperaturas mais altas. Esta informação se faz fundamental no conhecimento da dinâmica da infecção e distribuição do *Bd*, principalmente devido às lagostas serem animais comercializados globalmente, como a espécie *Procambarus clarkii* (BRANNELLY et al., 2015).

Determinadas espécies e se suas populações estão saudáveis, podem indicar com precisão o estado de conservação do ambiente em qual vivem (BOSCH, 2003), logo conhecer o status de conservação das comunidades de anuros nos fragmentos é também verificar a conservação de todo ecossistema local. Levando em consideração a riqueza de espécies endêmicas de Mata Atlântica no PNMAR (MOROTI et al., 2016) e a ampla distribuição do *Bd* no mesmo bioma, é fundamental detectar a presença deste fungo. A partir disso, dimensionar o impacto da infecção na comunidade de anuros e buscar compreender quais anfíbios podem estar mais susceptíveis a infecção causada pelo *Bd* e com os resultados estabelecer estratégias sanitárias para conter a infecção ou preservar uma área que pode estar ainda isolada da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a composição de espécies de anuros determinando a sua distribuição espacial e a sazonalidade correlacionando à presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a riqueza e a constância de ocorrência das espécies no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi
- Identificar variáveis climáticas e ambientais que influenciam a riqueza e a diversidade das espécies.
- Levantar dados sobre a ocorrência dos anuros nos ambientes determinando o uso do ambiente e a sazonalidade da vocalização.
- Avaliar a presença ou ausência do fungo *Bd* em anuros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo ocorreu no município de São José dos Campos, São Paulo. A cidade possui um território 1.102km² e com quase três séculos de constantes ampliações, possui suas paisagens altamente fragmentadas, restando apenas 10,17% de sua área coberta por fragmento de mata atlântica (MORELLI et al., 2003). O sistema de classificação desenvolvido por Köppen classificou o clima da cidade no tipo Aw, onde a temperatura máxima varia entre 23,3° e 30,2°C e a temperatura mínima variando entre 11,7°C e 19,8°C. Os meses de junho a agosto são os mais secos, com valores menores a 50mm de pluviosidade, no entanto em janeiro, que é o mês mais chuvoso, os valores chegam a 210,7mm (SCOFIELD et al., 2000).

A área amostrada pertence ao Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (PNMAR) (23° 04'20" S, 45° 55'56" W), que fica localizada na estrada do Turvo, próxima ao bairro do Costinha, zona rural, distante cerca de 20 km do centro da cidade de São José dos Campos, estado de São Paulo (Figura 1). A área compreende um total de 2.467.436,75 m², em terreno montanhoso, variando de 640 a 1040 m de altitude (Figura 2). A área foi adquirida entre os anos de 1902 e 1932 pela prefeitura de São José dos Campos e era anteriormente chamada de Reserva Florestal da Boa Vista no ano 1979, a reserva foi criada pela lei municipal 2.163/79 de 6 de abril de 1979 e sua denominação alterada para Reserva Ecológica Augusto Ruschi em 1986, em homenagem ao naturalista que dedicou a vida ao estudo da fauna e flora brasileira. Em setembro de 1982 foi integrada a Área de Proteção Ambiental – APA da bacia do Rio Paraíba do Sul (SILVA, 1989).

Em 17 de setembro de 2010, a reserva foi enquadrada na categoria Unidade de Conservação de Proteção Integral, pela lei municipal n. 8.195, se tornando a primeira unidade de conservação da cidade, tornando o Parque Natural Municipal Augusto Ruschi. O principal objetivo da área é a preservação do ecossistema natural, sendo permitidas apenas atividades de desenvolvimento de educação, recreação com a natureza, turismo ecológico e pesquisas científicas.

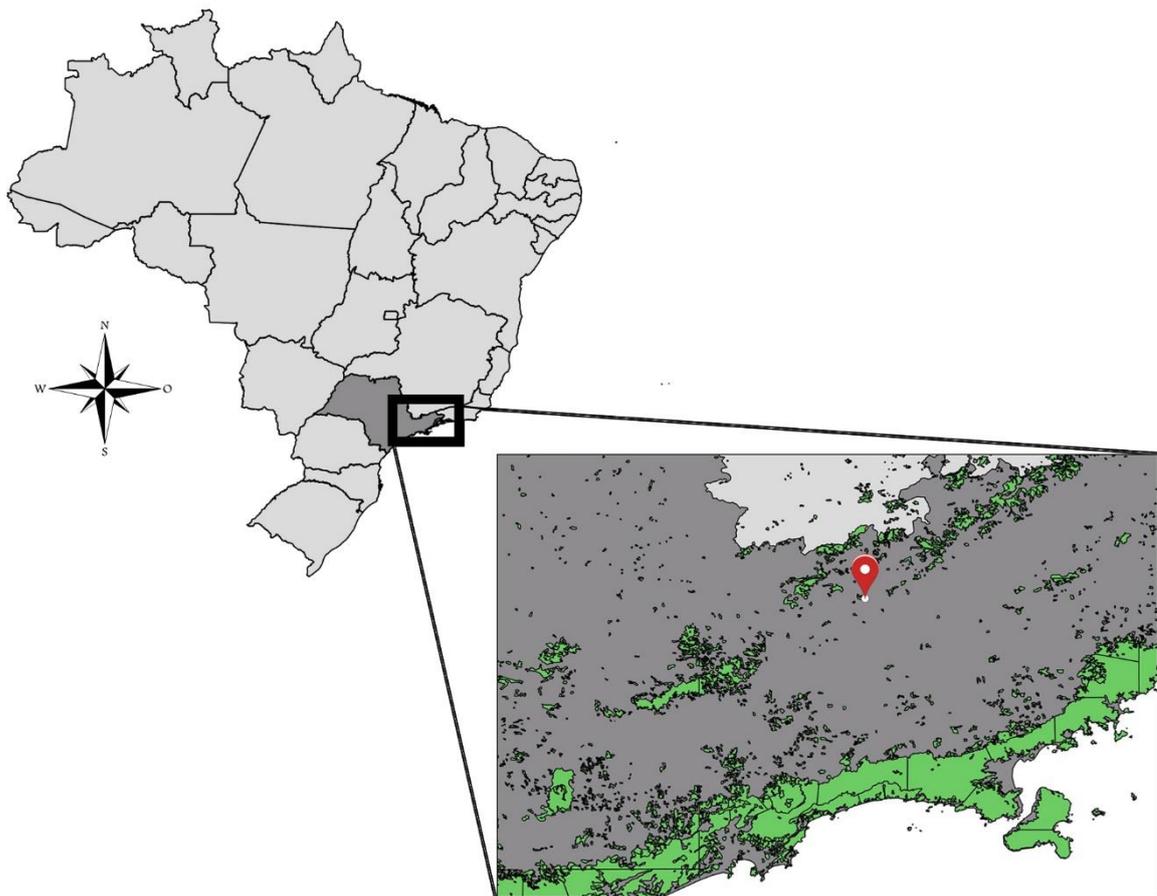


Figura 1: O mapa a esquerda mostra o mapa do Brasil, com destaque para o estado de São Paulo. O mapa a direita e o ponto vermelho, indicam a localização do fragmento de Mata Atlântica pertencente ao Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (23° 04'20" S, 45° 55'56" W), no município de São José dos Campos, São Paulo. Os mapas foram realizados por meio do programa QGis®.



Figura 2: Imagem de satélite do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, o traçado amarelo indica os limites da unidade de conservação. Imagem obtida por meio do programa Google Earth®

4.2 Metodologia de campo

As visitas a campo e projeto-piloto tiveram início no mês de maio de 2015 com saídas para reconhecimento e estabelecimento da área a ser estudada e período amostral. Em agosto de 2015, iniciaram as visitas com coletas de dados, se encerrando em julho de 2016, totalizando 12 meses de estudo. Foram realizadas quatro saídas mensais, distribuídas ao longo de cada mês, em ambos os períodos (diurno e noturno). Nas observações noturnas foram utilizadas lanternas de cabeça com luz branca.

Foram utilizadas três metodologias para amostragem de anuros (HEYER; DONNELLY; MCDIARMID, 1994), que consistiram em: a) Busca ativa: consiste na procura de anfíbios em troncos, pedras, bromélias e demais refúgios encontrados; b) Transecção por busca auditiva: Ocorreu em duas trilhas já existentes no interior da área de estudo, que foram percorridas de forma lenta, a fim de amostrar anuros que vocalizam em poças temporárias, serrapilheira, em córregos no interior de mata ou distantes de corpos d'água; e c) procura em sítios de reprodução.

Todos os espécimes encontrados foram registrados e identificados taxonomicamente por meio de guias de identificação de Anfíbios da Mata Atlântica (HADDAD et al., 2013) e demais trabalhos de descrição de cada espécie. As espécies encontradas vocalizando, tiveram registrados os dados do micro-habitat (poça temporária em área aberta, poça temporária em área florestal, serrapilheira, lagoa permanente, riacho em área aberta e riacho em área florestal), macro-habitat (área florestal, área aberta e borda de mata) e o respectivo sitio de vocalização utilizados para a reprodução. Para a formulação dos mapas de calor, indicando a área de encontro das espécies e suas respectivas distribuições e abundância, foram consideradas apenas as espécies em vocalização durante o período estudado, a fim de determinar quais áreas do PNMAR são utilizadas para reprodução de cada espécie. Cada indivíduo em atividade de vocalização ou visualizado teve sua coordenada anotada para a posterior análise no programa Qgis®. As informações das coordenadas geográficas foram obtidas com o auxílio de GPS Garmin Etrex10.

A confirmação da identidade das espécies se deu por comparação dos exemplares coletados com material depositado nas coleções científicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Os exemplares capturados foram eutanasiados, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade do Vale do Paraíba, sendo posteriormente fixados em formol 10% e conservados em álcool a 70%. Os espécimes testemunhos se encontram depositados

nas coleções científicas da UNICAMP e da UFMS (Tabela 1). As coletas dos exemplares foram efetuadas mediante licença do IBAMA/ICMBio/SISBio nº: 48620-2 e do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 05/CEUA/2014).

4.3 Metodologia de coleta de amostra biológica

A captura dos anuros foi realizada de modo manual por meio de busca ativa. A coleta de material biológico segue o protocolo sugerido por Hyatt et al. (2007) e Lambertini et al. (2013), com a aplicação de *swabs* na superfície epidérmica, dorsal, ventral, de dedos e membranas interdigitais (Figura 3), cinco vezes em cada superfície. Todos os animais foram manipulados com luvas cirúrgicas descartadas após o término do procedimento, a fim de evitar a contaminação por contato cruzado. A escolha da utilização do *swab* foi feita por ser um método não invasivo, prático para utilizações em campo que possibilita a utilização com segurança para os diferentes estágios evolutivos dos anuros, além de ser pouco estressante para os animais.



Figura 3: Forma de coleta de amostra biológica utilizada seguindo os protocolos propostos por Hyatt et al., 2007 e Lambertini et al. (2013). (a) Anuro encontrado vocalizando por meio de busca ativa; (b) Captura de modo manual com auxílio de luvas e coleta de material biológico com a aplicação de *swabs* na superfície epidérmica dorsal, (c) ventral, (d) dedos e membranas interdigitais.

Para evitar possíveis recapturas e contaminação foi determinado um dia específico de amostragem para cada espécie. Cada indivíduo capturado foi acondicionado em um saco plástico individual e solto apenas quando todas as capturas de amostras foram finalizadas. Logo, após a coleta dos dados os animais eram soltos no mesmo lugar em que foram capturados.

Os *swabs* foram acondicionados em criotubos (tubos criogênicos) de 1,5 mL (secos) e estocados em um freezer convencional à -20°C até o momento do uso. As coletas de amostra biológica dos exemplares foram efetuadas mediante licença do IBAMA/ICMBio/SISBio nº: 48620-2 e do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 05/CEUA/2014).

4.4 Identificação molecular do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Após a coleta do material, a extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo proposto por Lambertini et al. (2013). De acordo com os passos: 1- Foi adicionados 100 µL do reagente PrepMan ULTRA® (Applied Biosystems) a cada criotubo contendo o swab; 2- Os tubos foram agitados em vortex por 45 segundos, centrifugados por 30 segundos a 12.000 r.p.m e posteriormente agitados em vortex novamente por 45 segundos e centrifugados por 30 segundos a 12.000 r.p.m; 3- Aquecidos em banho com água fervente por 10 minutos, resfriados em temperatura ambiente por 2 minutos; 4- centrifugados por 1 minuto a 12.000 RPM, logo após ocorreu a inversão do swab dentro do criotubo, utilizando pinças flambadas a cada inversão, e depois centrifugados por 5 minutos a 12.000 RPM. Os swabs após o último procedimento, foram descartados e os criotubos centrifugados rapidamente por alguns segundos. Logo após, foi transferido 45 µL da solução para novos tubos; 5- Já nos novos tubos, estes foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 RPM e preparados uma diluição de 1:10 do material genético que foram estocados. A amplificação do DNA é realizada por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), de acordo com o protocolo de Lambertini et al. (2013) e utilizou os iniciadores (primers) específicos do *Bd*: Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3'), e Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'). Para uma reação com volume final de 25 µL, foi preparado um mix contendo 1 µM de cada primer, MgCl₂ (0.9 mM), 1XTaq Buffer, 0.2 mM de cada dNTP e 0.8 U de TaqPolymerase. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 93°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a reação de PCR, aproximadamente

10 μ L de cada amplificado foi analisado em gel de agarose 0,7%, juntamente com um 1kb DNA *ladder*, utilizado como um padrão de tamanho de DNA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta. O resultado é considerado positivo para presença de *Bd* quando forem visualizadas bandas de amplificação de aproximadamente 300 pb. As análises moleculares (Figura 4) para a detecção do fungo foram realizadas no laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), na Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, estado de São Paulo.



Figura 4: Análise molecular realizada no laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), na Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, estado de São Paulo. (a) Adição de 100 μ L do reagente PrepMan ULTRA® em cada criotubo contendo o *swab*; (b, c) inversão do *swab* dentro do criotubo, utilizando pinças flambadas a cada inversão; (d, e) Preparação da diluição 1:10 em ambiente estéril; (f) Preparação do mix com volume final de 25 μ L; (g) Termociclador programado para amplificação do material; (h, i) Após a reação de PCR, o material foi preparado para ser analisado em gel de agarose 0,7%, juntamente com um DNA ladder como um padrão de tamanho de DNA.

4.5 Análise estatística

Para análise dos dados abióticos foi realizada uma análise de regressão entre os dados ambientais (temperatura média, mínima e máxima mensal e pluviosidade) e o número de espécies em atividade de vocalização, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Para essas análises e para realização dos gráficos de dispersão foi utilizado o programa BioEstat 5.0[®]. As informações sobre os fatores abióticos foram adquiridas por meio da plataforma online do site “www.wunderground.com”, com a estação meteorológica localizada a 20km da área de estudo.

A ocorrência das espécies registradas foi avaliada pelo uso do índice de constância de ocorrência (DAJOS, 1978), com classificação em: Frequentes (F): espécies que estiveram presentes em 40% ou mais da amostragem; Ocasionais (O) presentes entre 15% e 40% das amostragens; Raras (R): quando estiveram presentes menos que 15% das amostragens. A curva do coletor foi calculada a partir da média de 50 aleatorizações geradas com os dados obtidos em campo pelo programa EstimateS versão 6.0b1.

Para análise da distribuição espacial foram categorizados em macro-habitats e micro-habitats. Os macro-habitats foram classificados em: área aberta, borda de mata (área de transição) e área florestal. Os micro-habitats foram diferenciados pelo tipo de ambiente utilizado como sítio de vocalização utilizado: Poça temporária em área aberta (PTAA), poça temporária em área florestal (PTAF), riacho em área florestal (RAF), riacho em área aberta (RAA), serrapilheira (SER) e lagoa permanente (LP). Para análise da similaridade da anurofauna dos macro-habitats e micro-habitats, foi utilizado o índice de afinidade de Jaccard, com posterior análise de agrupamento (“clustering”) pelo método de média não ponderada por meio do uso do programa Past[®]. Para a realização das análises estatísticas foram utilizadas apenas as espécies em atividade reprodutiva durante o período amostrado.

5 RESULTADOS

5.1 Riqueza, Ocorrência e Diversidade

Foram registradas 33 espécies de anuros distribuídas em 19 gêneros, pertencentes a nove famílias (Tabela 1; Figura 5, 6 e 7): Brachycephalidae (n=3), Bufonidae (n=2), Craugastoridae (n=1), Hylidae (n=15), Hylodidae (n=1), Leptodactylidae (n=6), Microhylidae (n=2), Odontophrynidae (n=1) e Phyllomedusidae (n=2). O encontro da espécie *Scinax cardosoi* (Figura 6c) no PNMAR, consiste no primeiro registro de ocorrência da espécie para o estado de São Paulo. A assembleia de anuros do PNMAR é composta em sua maioria por espécies da família Hylidae (45,5%), seguidas pelas famílias Leptodactylidae (18,2%) e Brachycephalidae (9,1%), já as demais famílias totalizaram 27,2%.

Das 33 espécies encontradas no PNMAR, 82% foram encontradas em poucas amostragens, onde 12 espécies foram classificadas como ocasionais (36%) e 15 espécies (45% das espécies) classificadas como raras (Tabela 1). As espécies classificadas como frequentes representaram 18% da comunidade de anfíbios do PNMAR (n=6). As espécies que não foram visualizadas em atividade reprodutiva foram encontradas em poucas amostragens e em encontros fortuitos, logo este resultado não reflete a abundância populacional dessas espécies.

Tabela 1: Espécies de anuros registrados no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (PNMAR), município de São José dos Campos, estado de São Paulo, no período de agosto de 2015 e julho de 2016. A coluna “Figura” indica cada espécie fotografada no PNMAR nas figuras 5,6 e 7. Constância de ocorrência (Const.) indicado pelas letras F= Frequente, O=Ocasional, R=Rara. Coluna “Voucher” indica o número de tomo nas coleções científicas (ZUEC – Universidade Estadual de Campinas; ZUFMS e MAP – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul) *Espécie registrada apenas por meio de vocalização.

Família/espécies	Figura	Const.	Voucher
Brachycephalidae			
<i>Brachycephalus ephippium</i> (Spix, 1824)	5a	F	ZUEC 23296
<i>Ischnocnema</i> aff. <i>guentehri</i> (Steindachner, 1864)	5b	O	ZUEC 23303-04
<i>Ischnocnema</i> aff. <i>verrucosa</i> Reinhardt and Lütken, 1862	5c	R	ZUEC 23320-22
Bufonidae			
<i>Rhinella icterica</i> (Spix, 1824)	5d	R	ZUEC 23312
<i>Rhinella ornata</i> (Spix, 1824)	5e	O	ZUEC 23309
Craugastoridae			
<i>Haddadus binotatus</i> (Spix, 1824)	5f	F	ZUEC 23310-11
Hylidae			
<i>Aplastodiscus arildae</i> (Cruz e Peixoto, 1987)	5g	O	ZUEC 23298
<i>Aplastodiscus leucopygius</i> (Cruz e Peixoto, 1985)	5h	F	ZUEC 23299
<i>Bokermannohyla circumdata</i> (Cope, 1871)	5i	R	ZUEC 23325

<i>Bokermannohyla luctuosa</i> (Pombal e Haddad, 1993)	5j	F	ZUEC 23318-19
<i>Dendropsophus elegans</i> (Wied-Neuwied, 1824)	5k	O	ZUEC 23300
<i>Dendropsophus sanborni</i> (Schmidt, 1944)	5l	R	ZUEC 23301
<i>Hypsiboas faber</i> (Wied-Neuwied, 1821)	5m	F	ZUEC 23306
<i>Hypsiboas pardalis</i> (Spix, 1824)	5n	F	ZUEC 23302; 23336
<i>Hypsiboas prasinus</i> (Burmeister, 1856)	5o	O	ZUEC 23297
<i>Hypsiboas semilineatus</i> (Spix, 1824)	6a	R	ZUEC 23316
<i>Ololygon obtriangulata</i> (Lutz, 1973)	6b	O	ZUEC 23331-34
<i>Scinax cardosoi</i> (Carvalho-e-Silva e Peixoto, 1991)	6c	R	ZUEC 23323
<i>Scinax crospedospilus</i> (Lutz, 1925)	6d	O	ZUEC 23314
<i>Scinax fuscovarius</i> (Lutz, 1925)	6e	R	MAP 1641
<i>Scinax hayii</i> (Barbour, 1909)	6f	R	ZUEC 23326
Hylodidae			
<i>Hylodes</i> aff. <i>sazimai</i> (Haddad e Pombal, 1995)	6g	O	ZUEC 23324
Leptodactylidae			
<i>Adenomera marmorata</i> (Steindachner, 1867)	6h	R	ZUEC 23305; 23330
<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	6i	R	ZUEC 23315
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824)	6j	R	ZUEC 23328
<i>Leptodactylus latrans</i> (Linnaeus, 1758)	6k	R	*
<i>Leptodactylus mystacinus</i> (Burmeister, 1861)	6l	R	ZUEC 23327
<i>Physalaemus olfersii</i> (Lichtenstein e Martens, 1856)	6m	O	ZUEC 23317
Microhylidae			
<i>Chiasmocleis mantiqueira</i> (Cruz, Feio e Cassini, 2007)	6n	R	ZUFMS 03738
<i>Elachistocleis cesarii</i> (Miranda-Ribeiro, 1920)	6o	R	ZUEC 23329
Odontophrynidae			
<i>Proceratophrys boiei</i> (Wied-Neuwied, 1824)	7a	O	ZUEC 23307
Phyllomedusidae			
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i> Boulenger, 1882	7b	O	ZUEC 23308
<i>Pithecopus rohdei</i> (Mertens, 1926)	7c	O	ZUEC 23313

Em relação às metodologias de amostragem utilizadas, o método de busca em sítio de reprodução registrou 78% das espécies. O método de transecção por busca auditiva registrou 12%, sendo consideravelmente de espécies que vocalizavam em poças temporárias dentro das áreas florestais e/ou distantes dos riachos e do lago, por fim seguida pelo método de busca ativa que registrou 10% das espécies.

As espécies que não foram encontradas em atividades de reprodução foram amostradas apenas pelo método de busca ativa. A espécie *Leptodactylus latrans* foi amostrada apenas pelo método de transecção por busca auditiva, o que ressalta a importância da utilização de mais de um método de amostragem.

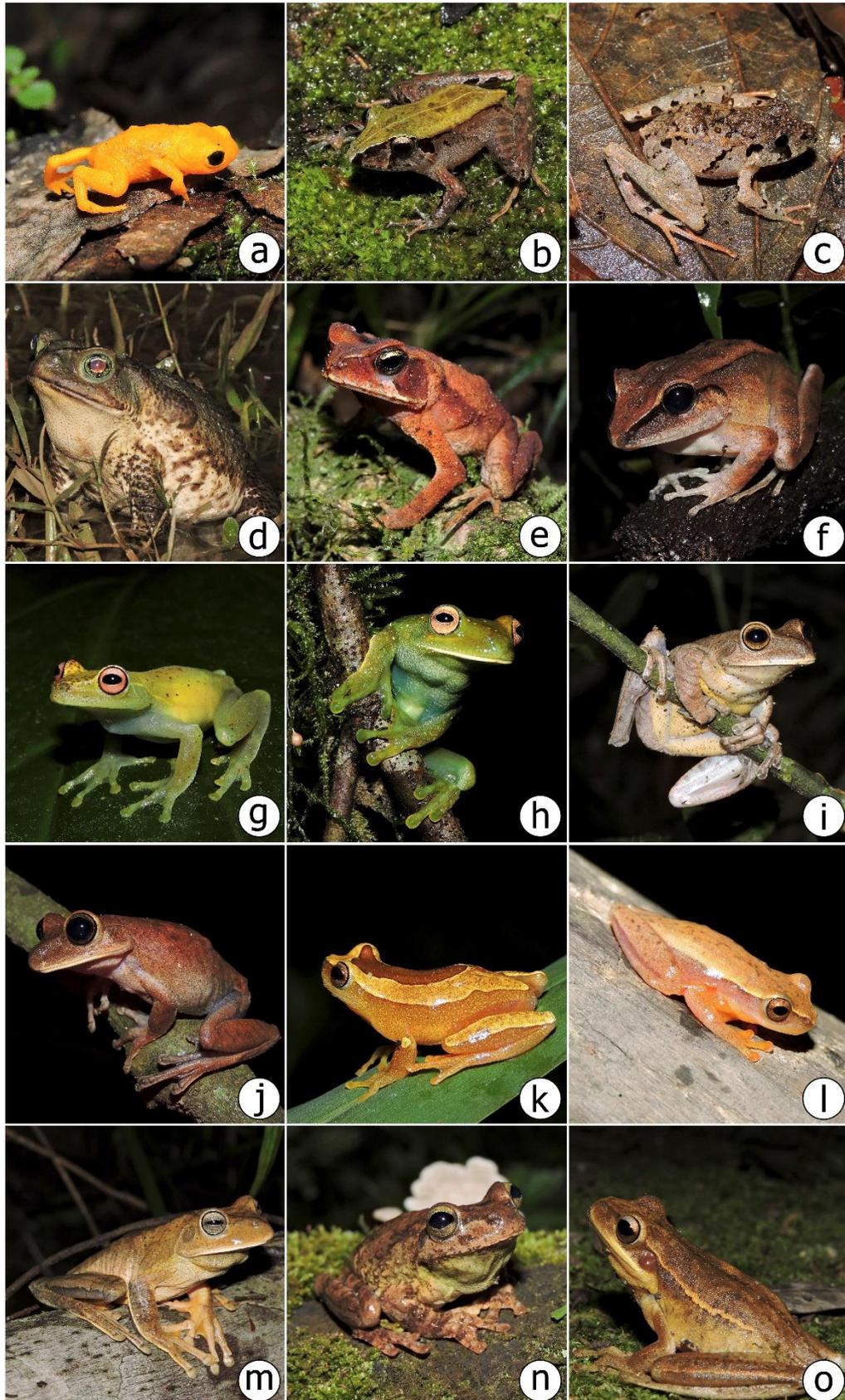


Figura 5: Espécies registradas no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi. (a) *Brachycephalus ephippium*; (b) *Ischnocnema* aff. *guentheri*; (c) *I. aff. verrucosa*; (d) *Rhinella icterica*; (e) *R. ornata*; (f) *Haddadus binotatus*; (g) *Aplastodiscus arildae*; (h) *A. leucopygius*; (i) *Bokermannohyla circumdata*; (j) *B. luctuosa*; (k) *Dendropsophus elegans*; (l) *D. sanborni*; (m) *Hypsiboas faber*; (n) *H. pardalis*; (o) *H. prasinus*.

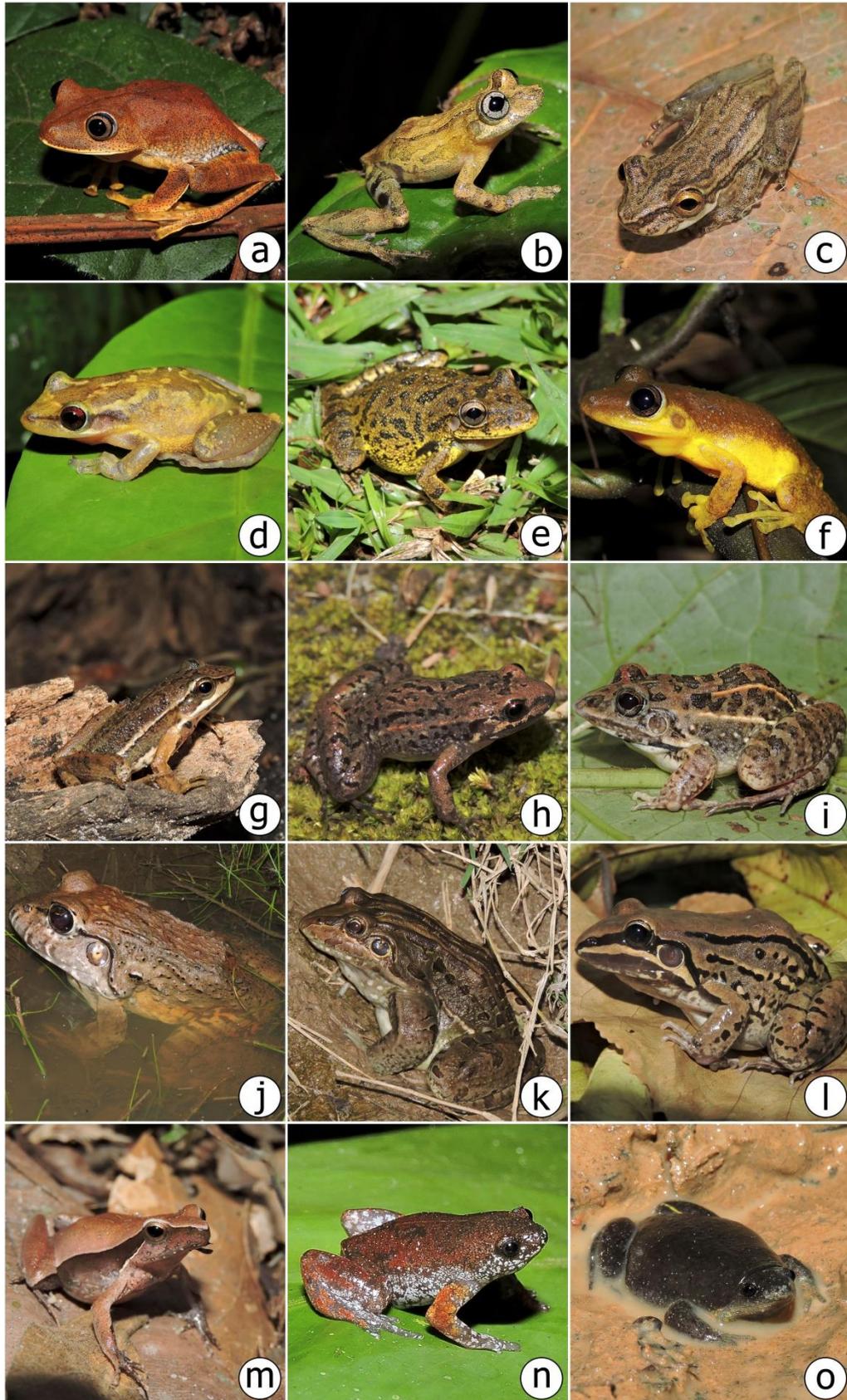


Figura 6: Espécies registradas no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi: (a) *Hypsiboas semilineatus*; (b) *Ololygon obtriangulata*; (c) *Scinax cardosoi*; (d) *S. crospedospilus*; (e) *S. fuscovarius*; (f) *S. hayii*; (g) *Hylodes* aff. *sazimai*; (h) *Adenomera marmorata*; (i) *Leptodactylus fuscus*; (j) *L. labyrinthicus*; (k) *L. latrans*; (l) *L. mystacinus*; (m) *Physalaemus olfersii*; (n) *Chiasmocleis mantiqueira*; (o) *Elachistocleis cesarii*.

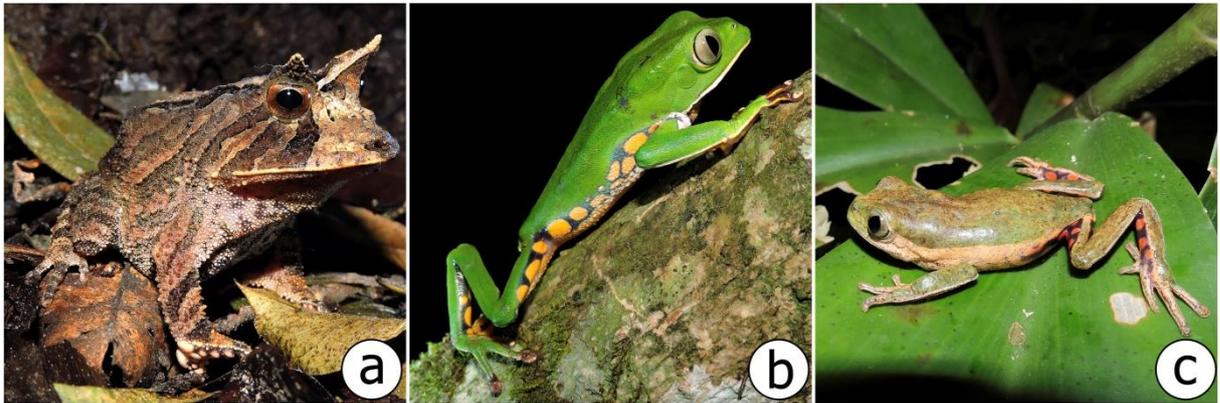


Figura 7: Espécies registradas no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi: (a) *Proceratophrys boiei*; (b) *Phyllomedusa burmeisteri*; (c) *Pithecopus rohdei*;

A curva do coletor demonstra um rápido aumento no acúmulo de espécies nos primeiros dias de coleta, porém a inclinação da reta apresenta uma ligeira tendência à estabilização (Figura 8). Por meio da acumulação de espécies foi obtida uma riqueza real de 33 espécies de anfíbios e riqueza estimada de $33 \pm 1,6$ espécies (amplitude = 32 a 34 espécies) de anfíbios para o PNMAR. Este resultado sugere que foram amostradas quase a totalidade das espécies com ocorrência para área, novas visitas a campo raramente acrescentarão espécies à lista do PNMAR.

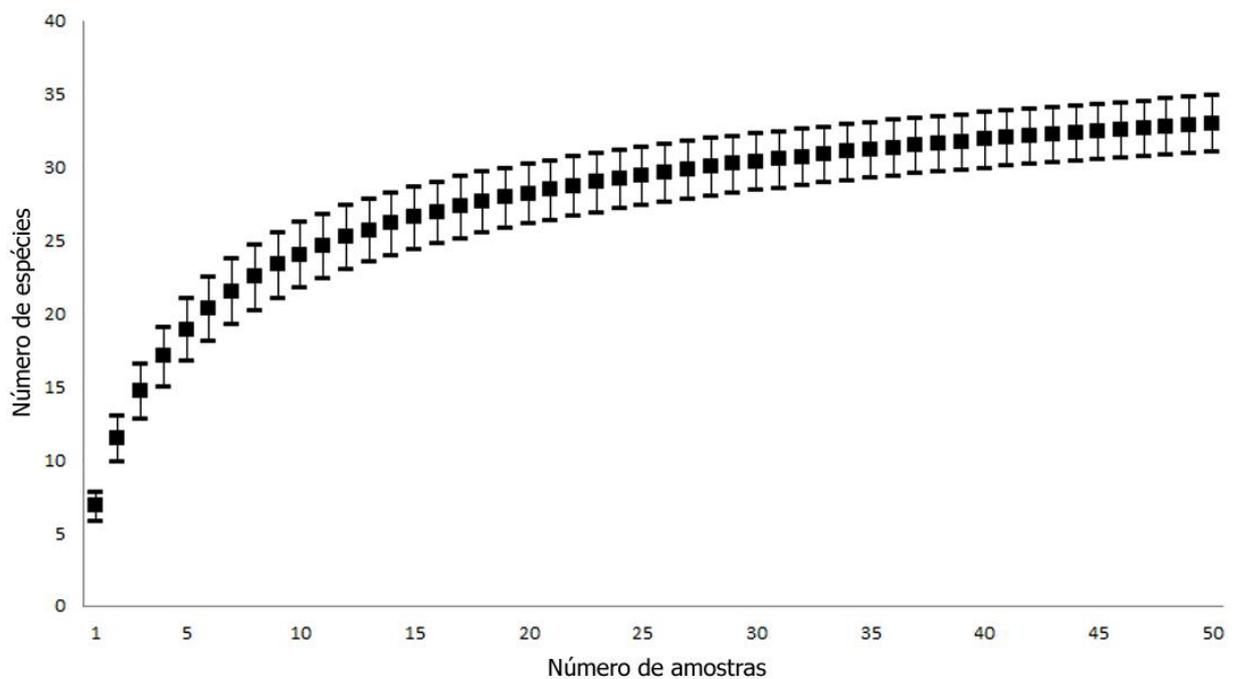


Figura 8: Curva do coletor, calculada com os dados obtidos entre agosto de 2015 e julho de 2016. Cada quadrado expressa a média de 50 pontos gerados pelo simulador EstimateS versão 6.0b1 e as barras indicam o desvio padrão calculado para cada ponto.

5.2 Distribuição espacial

Quanto a classificação de uso de macro-habitats, a área florestal apresentou uma maior riqueza (n=15), seguidas pelas de borda mata (n=13) e área aberta (n=9). Apenas a espécie *Hypsiboas faber* utilizou todos os ambientes para reprodução. Nos ambientes florestais apenas *Ololygon obtriangulata* e *Physalaemus olfersii* foram encontradas comuns aos outros habitats (Tabela 2). A análise de agrupamento dos macro-habitats permitiu visualizar dois agrupamentos para a comunidade de anuros (Coeficiente de correlação cofenético = 0,92). Os grupos foram: área aberta e borda de mata com 46,7% de semelhança na composição da comunidade; área florestal apresentou 84,6% de dissimilaridade em relação ao outro agrupamento, o que mostra que a maioria das espécies que utilizaram os ambientes florestais, foram restritas a esse habitat (Figura 9).

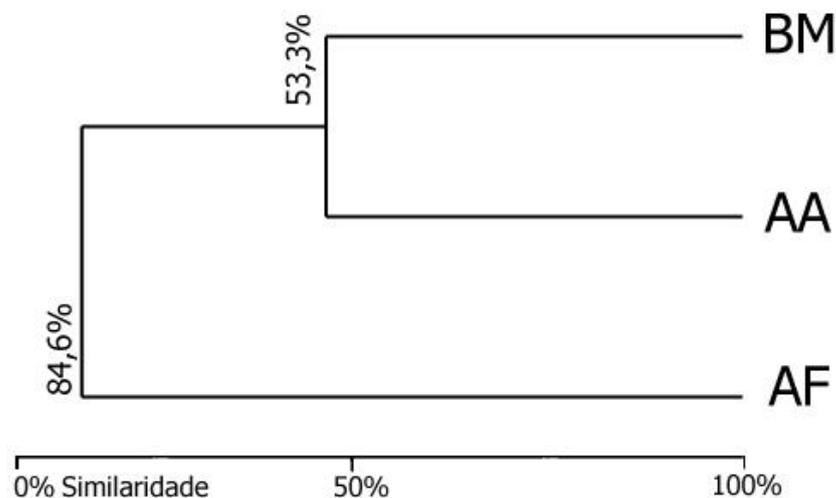


Figura 8: Para análise da similaridade da anurofauna dos macro-habitats (BM: Borda de mata, AA: Área Aberta e AF: Área Florestal) foi utilizado o índice de afinidade de Jaccard, com posterior análise de agrupamento. O eixo abaixo do cladograma indica a porcentagem de similaridade dos macro-habitats. As porcentagens indicadas nos cladogramas indicam a diferença entre os macro-habitats.

Em relação aos micro-habitats, a maior riqueza foi observada na lagoa permanente (n=12), seguidos pelo riacho em área florestal e poça temporária em área florestal, ambos com a mesma riqueza (n=6), serrapilheira (n=5), riacho em área aberta (n=3) e poça temporária em área aberta (n=2). A única espécie que esteve presente em todos micro-habitats, exceto serrapilheira, foi a espécie *H. faber*, o que a caracteriza como uma espécie generalista em quesitos reprodutivos. As espécies *H. pardalis*, *O. obtriangulata*, *P. olfersii*, *Rhinella ornata* também foram encontradas em mais de um micro-habitat (Tabela 2).

Tabela 2: Os macro-habitats foram classificados em: área aberta, borda de mata (área de transição) e área florestal. Os micro-habitats foram diferenciados pelo tipo de ambiente utilizado como sítio de vocalização utilizado: Poça temporária em área aberta (PTAA), poça temporária em área florestal (PTAF), riacho em área florestal (RAF), riacho em área aberta (RAA), serrapilheira (SER) e lagoa permanente (LP). (+) Presença; (-) Ausência; **espécies que não foram encontradas vocalizando.

Família/Espécies	Macro-habitats			Microhabitat
	Área aberta	Borda de mata	Área florestal	
Brachycephalidae				
<i>Brachycephalus ephippium</i>	-	-	+	SER
<i>Ischnocnema aff. guentheri</i>	-	-	+	SER
<i>Ischnocnema aff. verrucosa</i>	-	-	+	SER
Bufonidae				
<i>Rhinella icterica</i>	**	**	**	**
<i>Rhinella ornata</i>	+	+	-	RAA/LP
Craugastoridae				
<i>Haddadus binotatus</i>	-	-	+	SER
Hylidae				
<i>Aplastodiscus arildae</i>	-	-	+	RAF
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	-	-	+	RAF
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	**	**	**	**
<i>Bokermannohyla luctuosa</i>	-	-	+	RAF
<i>Dendropsophus elegans</i>	+	+	-	LP
<i>Dendropsophus sanborni</i>	+	+	-	LP
<i>Hypsiboas faber</i>	+	+	+	RAA / LP/ PTAF / RAF
<i>Hypsiboas pardalis</i>	+	-	-	RAA/LP
<i>Hypsiboas prasinus</i>	+	+	-	LP
<i>Hypsiboas semilineatus</i>	-	+	-	LP
<i>Ololygon obtriangulata</i>	-	+	+	PTAF/LP
<i>Scinax cardosoi</i>	-	-	+	PTAF
<i>Scinax crospedospilus</i>	+	+	-	LP
<i>Scinax fuscovarius</i>	**	**	**	**
<i>Scinax hayii</i>	-	-	+	PTAF
Hylodidae				
<i>Hylodes aff. sazimai</i>	-	-	+	RAF
Leptodactylidae				
<i>Adenomera marmorata</i>	-	+	-	SER
<i>Leptodactylus fuscus</i>	+	-	-	PTAA
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	**	**	**	**
<i>Leptodactylus latrans</i>	-	+	-	LP
<i>Leptodactylus mystacinus</i>	**	**	**	**
<i>Physalaemus olfersii</i>	-	+	+	PTAF/LP
Microhylidae				
<i>Chiasmocleis mantiqueira</i>	-	-	+	PTAF
<i>Elachistocleis cesarii</i>	+	-	-	PTAA
Odontophrynidae				
<i>Proceratophrys boiei</i>	-	-	+	RAF

Phyllomedusidae

<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	-	+	-	LP
<i>Pithecopus rohdei</i>	-	+	-	LP
Total	9	13	15	

A análise de agrupamento dos micro-habitats permitiu visualizar cinco agrupamentos para a comunidade de anuros (Coeficiente de correlação cofenético = 0,9745). Os grupos foram: Riacho em área florestal (9,6% de similaridade), poça temporária em área florestal (15,5% de similaridade), lagoa permanente e riacho em área aberta (33,1% de similaridade) e posteriormente serrapilheira e poça temporária em área aberta que apresentaram cada um 100% de dissimilaridade em relação aos outros grupos e entre si (Figura 10).

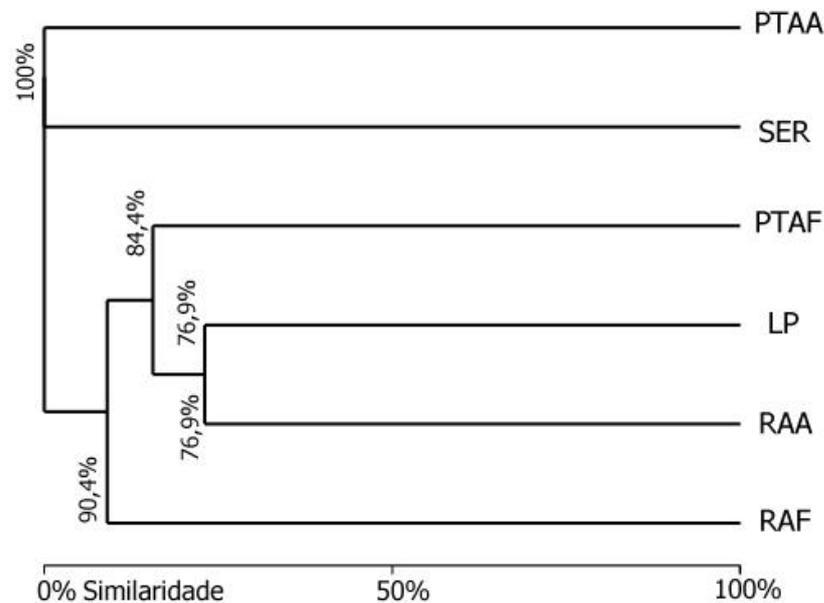


Figura 9: Para análise da similaridade da anurofauna dos micro-habitats (PTAA: poça temporária em área aberta, SER: Serrapilheira, PTAF: poça temporária em área florestal, LP: lagoa permanente, RAA: riacho em área florestal e RAF: riacho área florestal) foi utilizado o índice de afinidade de Jaccard, com posterior análise de agrupamento. O eixo abaixo do cladograma indica a porcentagem de similaridade dos micro-habitats. As porcentagens indicadas nos cladogramas indicam a diferença entre os micro-habitats.

Das 33 espécies encontradas foram desenvolvidos mapas para as 28 espécies em atividade reprodutiva (vocalização) ao longo de sua distribuição no PNMAR (Figura 11-39). Os mapas de calor indicam a densidade de pontos de encontros ou de visualizações das espécies em atividade de vocalização. Os mapas estão divididos em três imagens: a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; c) indica o habitat a qual o espécime foi encontrado.

Brachycephalus ephippium (Anura: Brachycephalidae)

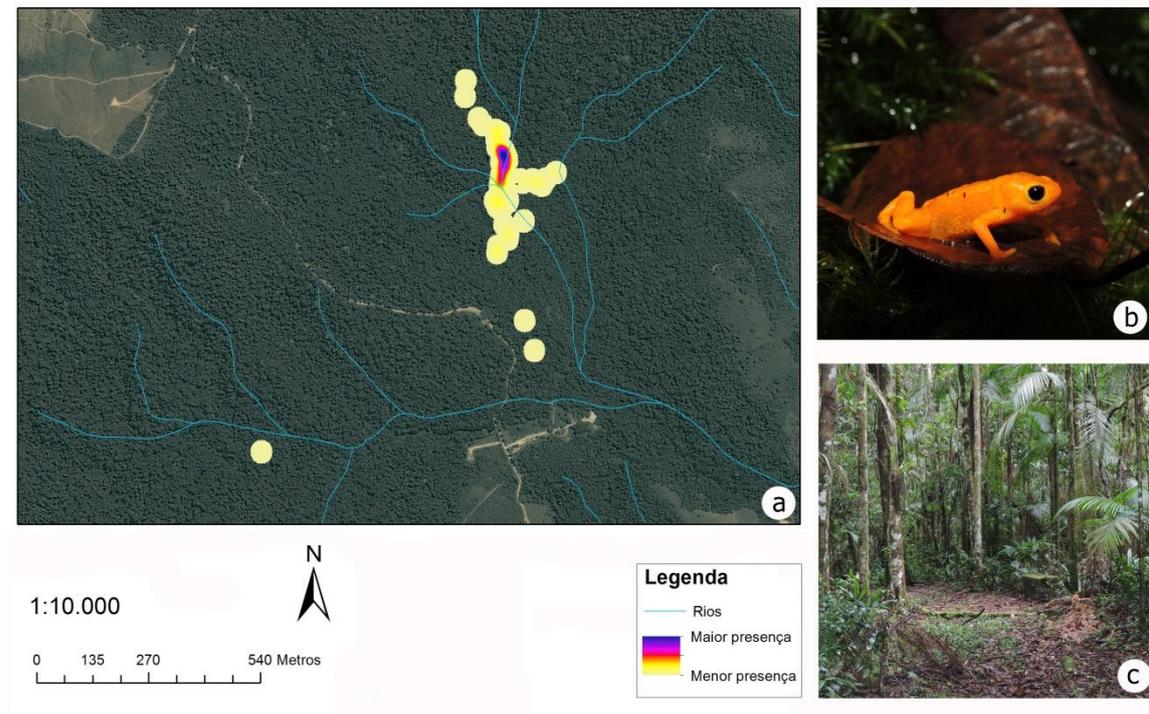


Figura 10: Mapa de calor da espécie *Brachycephalus ephippium*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Ischnocnema aff. guentheri (Anura: Brachycephalidae)

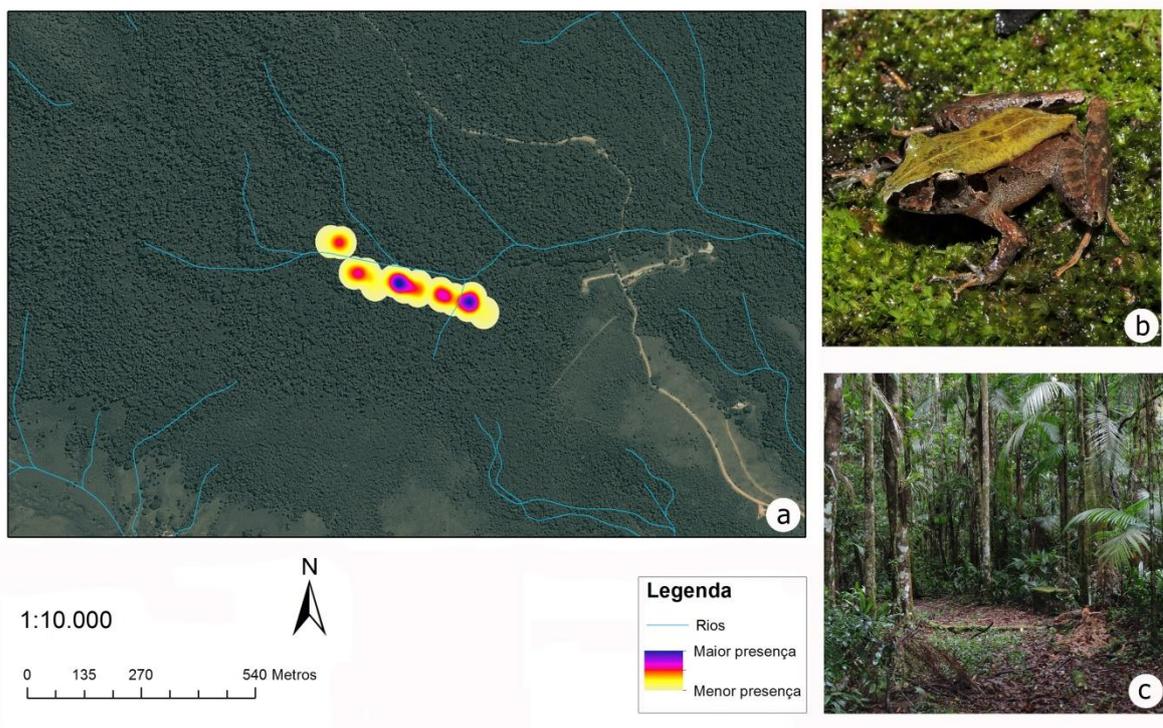


Figura 11: Mapa de calor da espécie *Ischnocnema aff. guentheri*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Ischnocnema aff. verrucosa (Anura: Brachycephalidae)

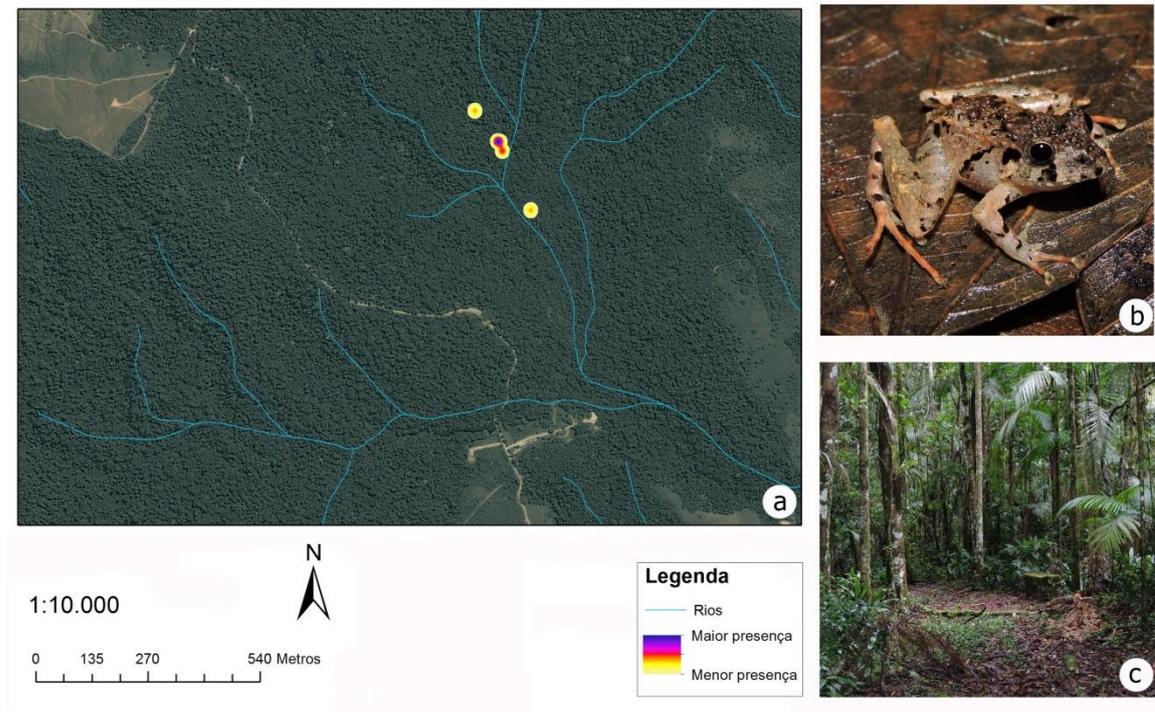


Figura 13: Mapa de calor da espécie *Ischnocnema aff. verrucosa*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Rhinella ornata (Anura: Bufonidae)

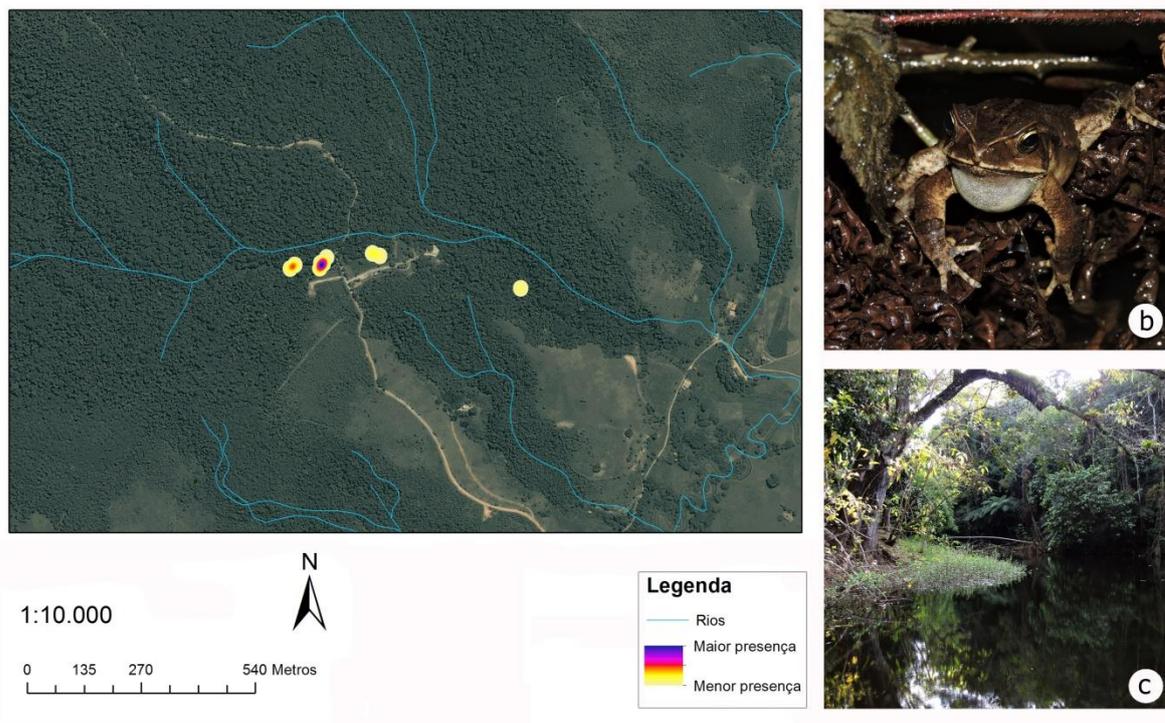


Figura 14: Mapa de calor da espécie *Rhinella ornata*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Haddadus binotatus (Anura: Craugastoridae)

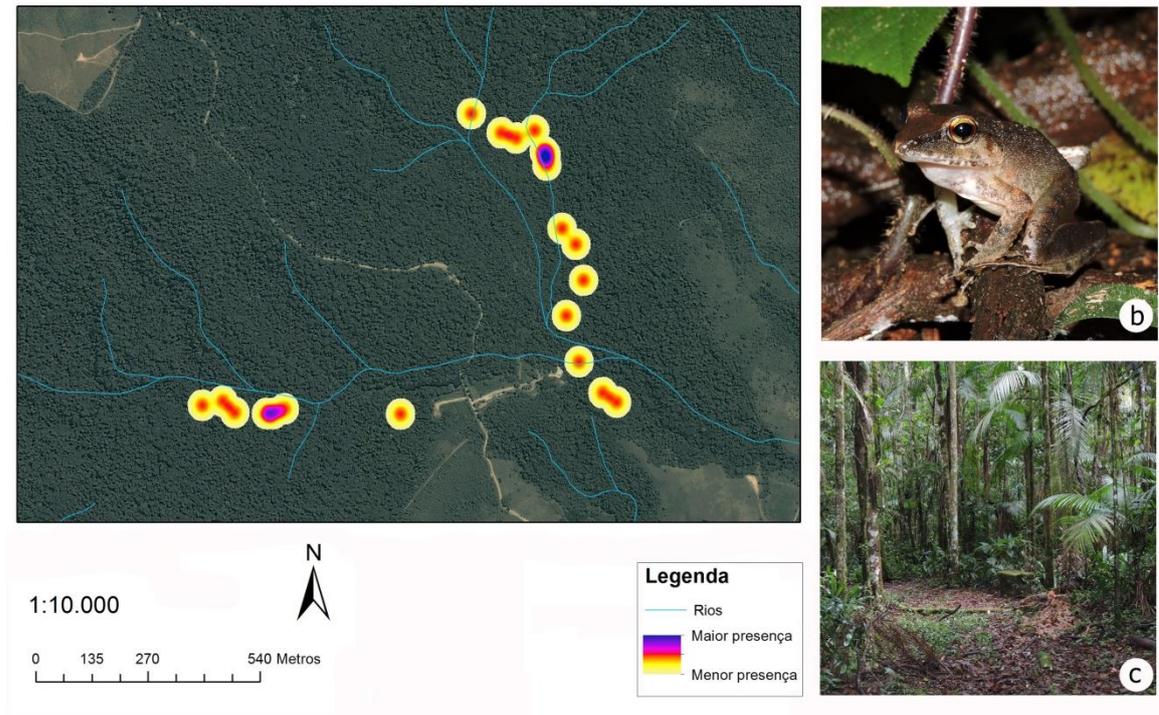


Figura 12: Mapa de calor da espécie *Haddadus binotatus*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Proceratophrys boiei (Anura: Odontophrynidae)

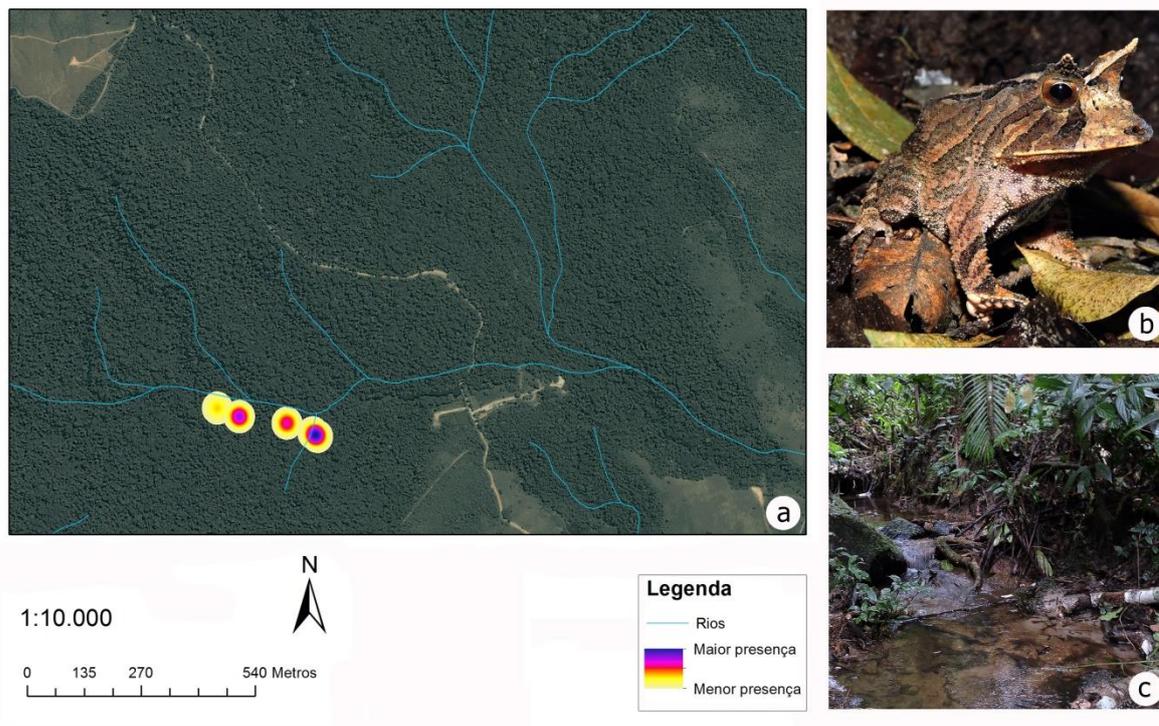


Figura 16: Mapa de calor da espécie *Proceratophrys boiei*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Aplastodiscus arildae (Anura: Hylidae)

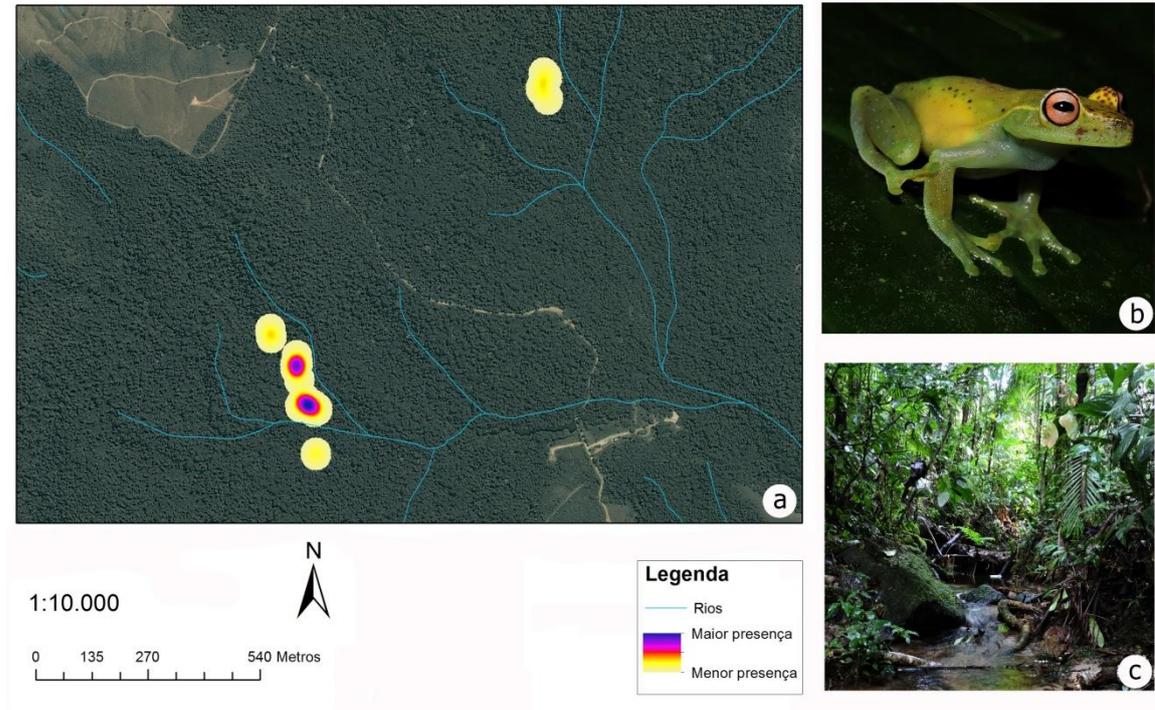


Figura 13: Mapa de calor da espécie *Aplastodiscus arildae*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Aplastodiscus leucopygius (Anura: Hylidae)

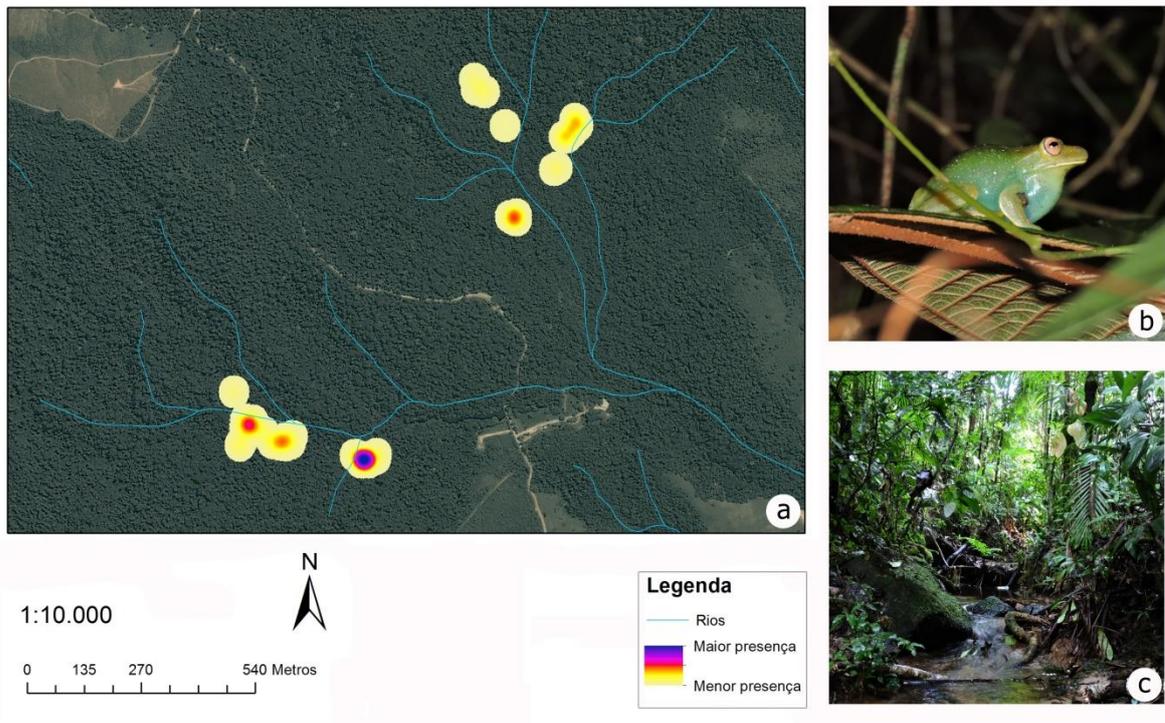


Figura 14: Mapa de calor da espécie *Aplastodiscus leucopygius*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Bokermannohyla luctuosa (Anura: Hylidae)

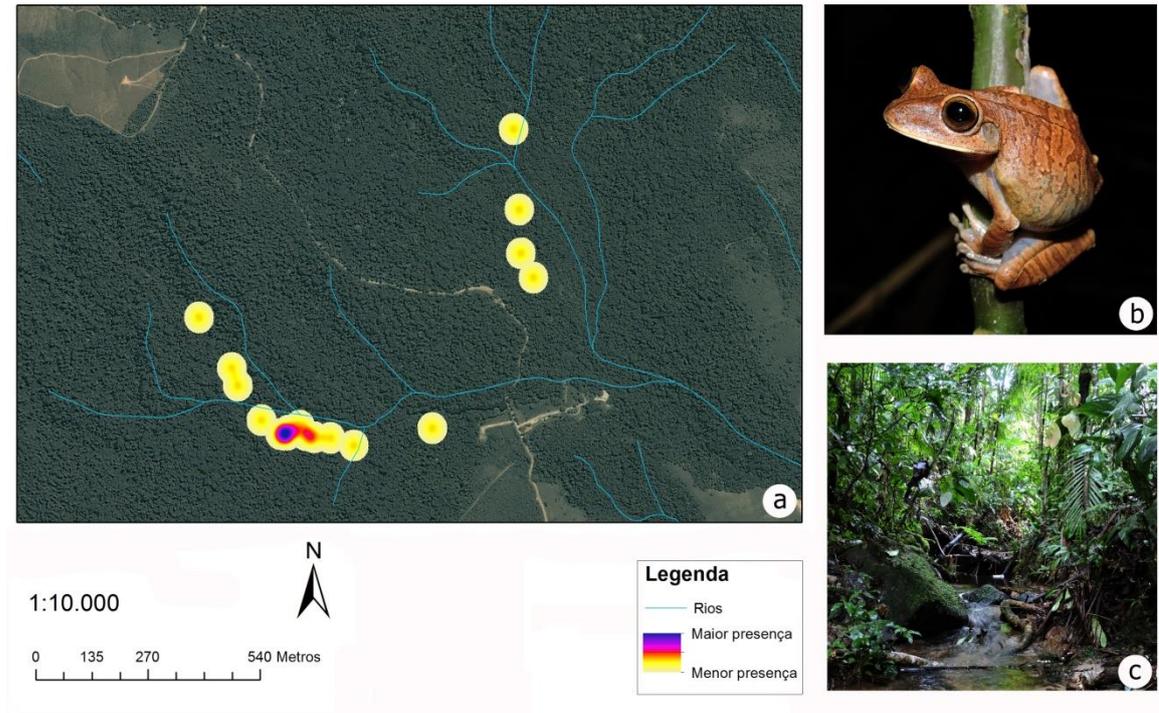


Figura 19: Mapa de calor da espécie *Bokermannohyla luctuosa*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Dendropsophus elegans (Anura: Hylidae)

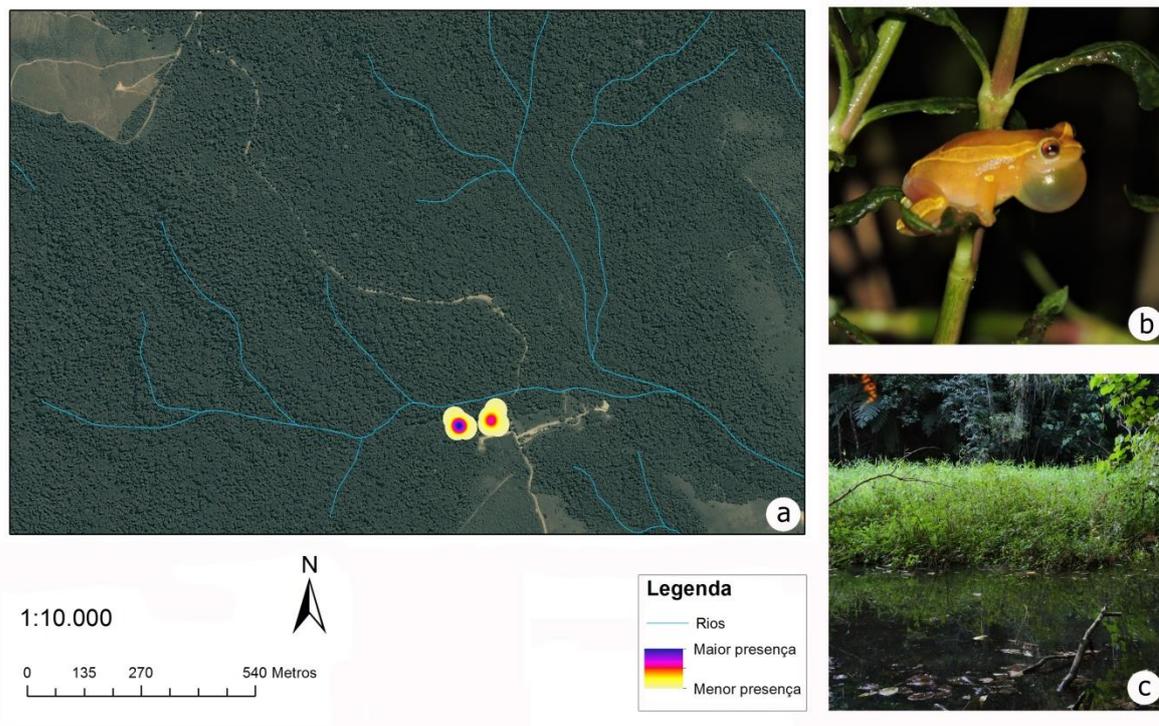


Figura 20: Mapa de calor da espécie *Dendropsophus elegans*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Dendropsophus sanborni (Anura: Hylidae)

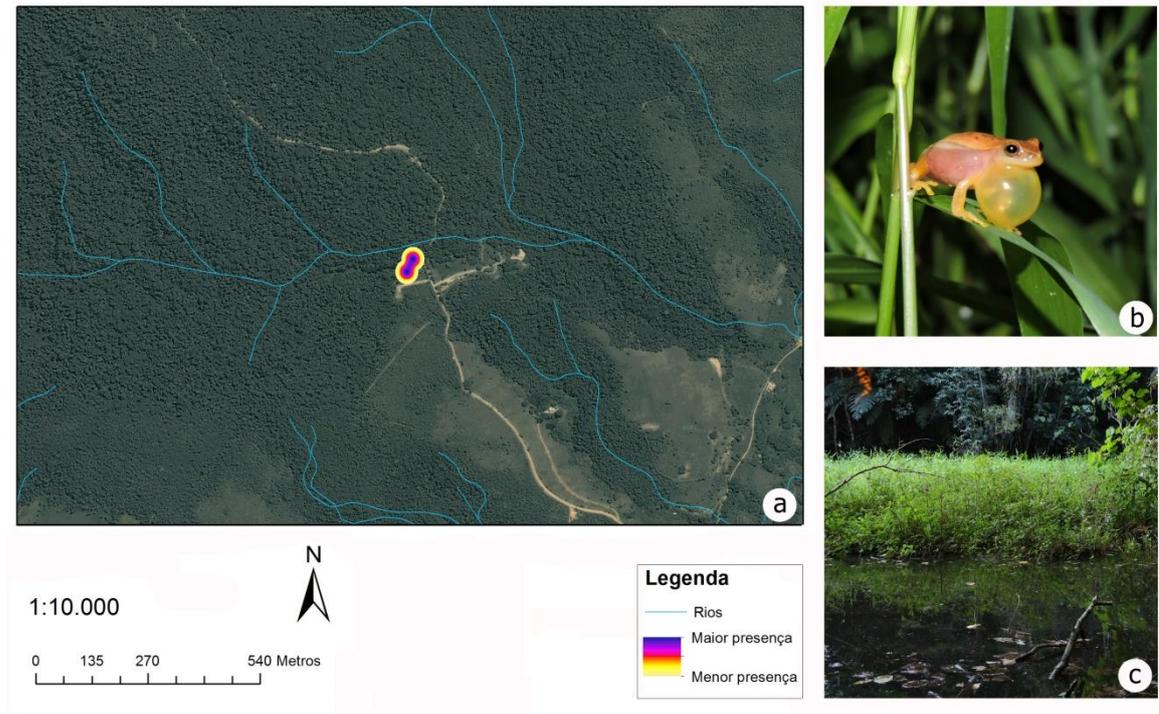


Figura 21: Mapa de calor da espécie *Dendropsophus sanborni*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Hypsiboas faber (Anura: Hylidae)

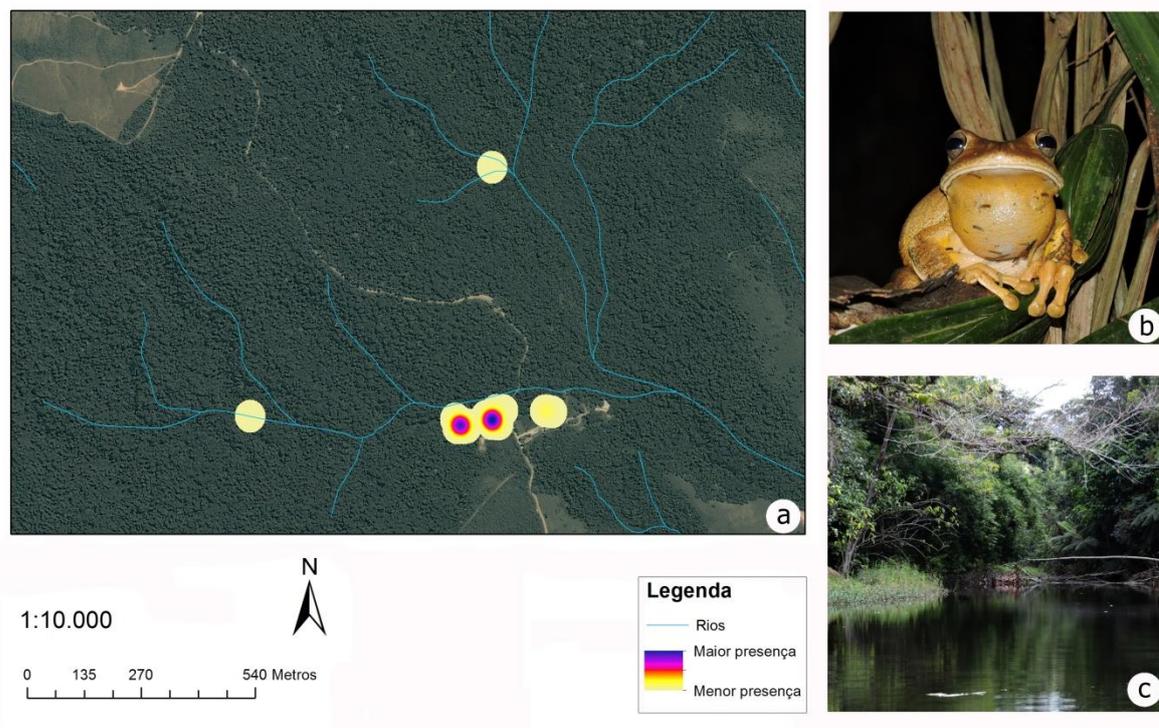


Figura 22: Mapa de calor da espécie *Hypsiboas faber*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica um dos sítios de vocalização utilizados para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Hypsiboas pardalis (Anura: Hylidae)

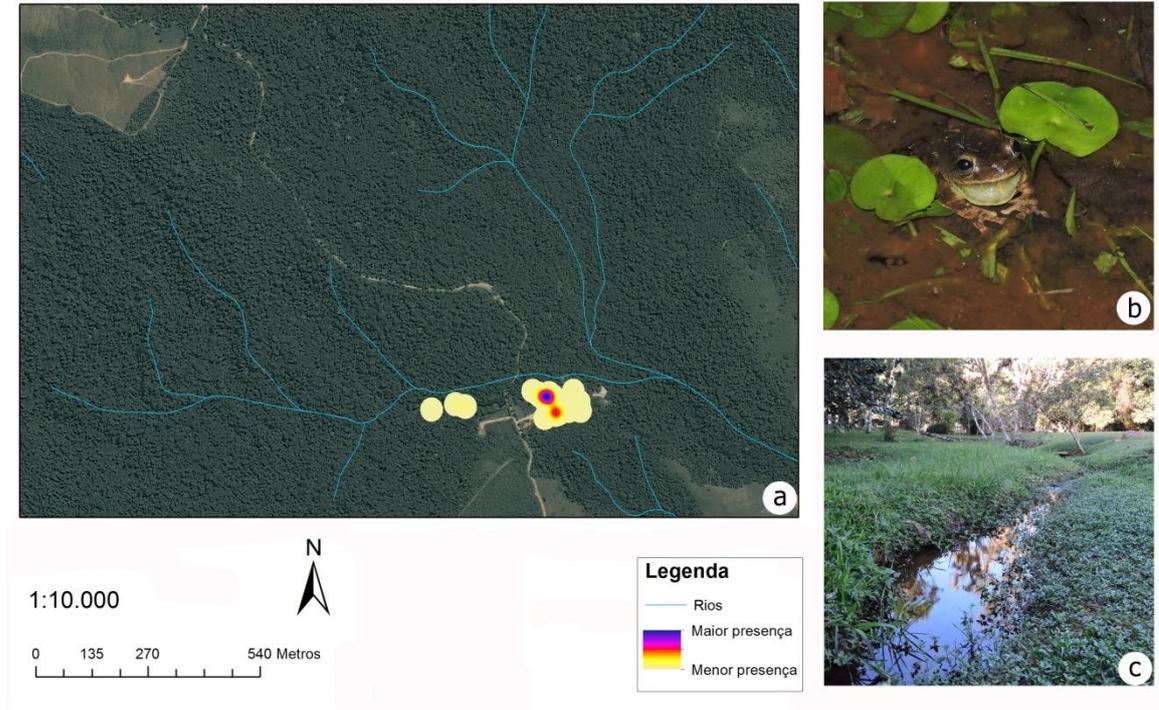


Figura 23: Mapa de calor da espécie *Hypsiboas pardalis*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Hypsiboas prasinus (Anura: Hylidae)

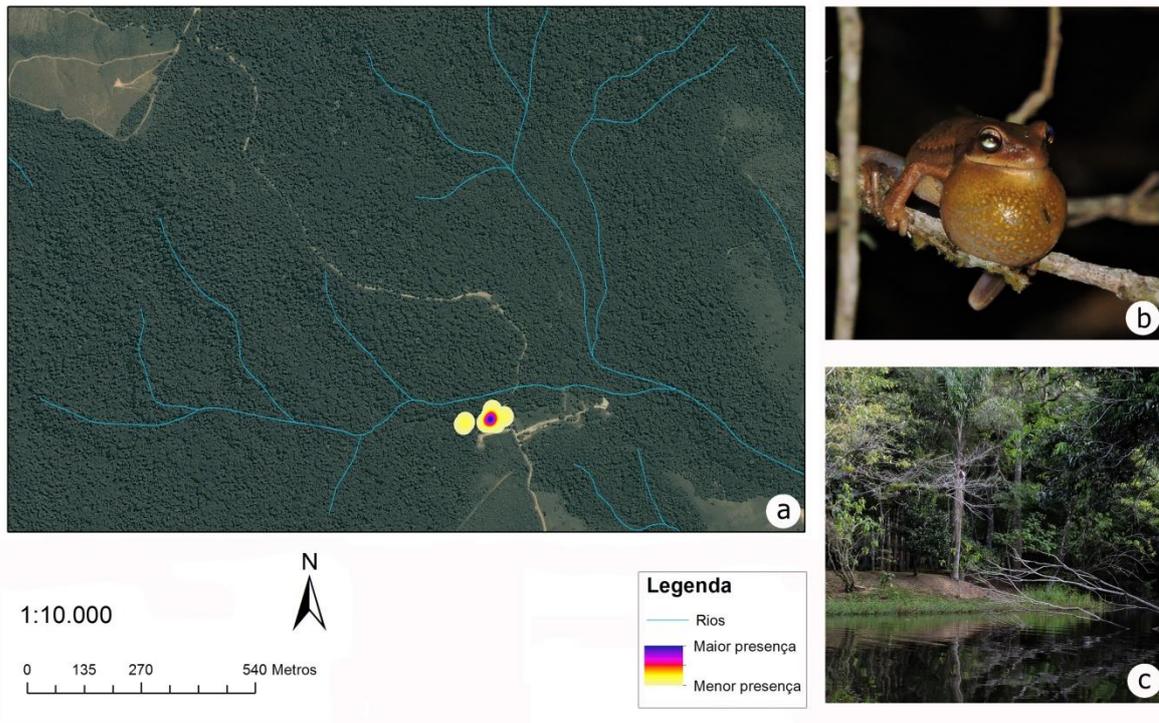


Figura 24: Mapa de calor da espécie *Hypsiboas prasinus*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Hypsiboas semilineatus (Anura: Hylidae)

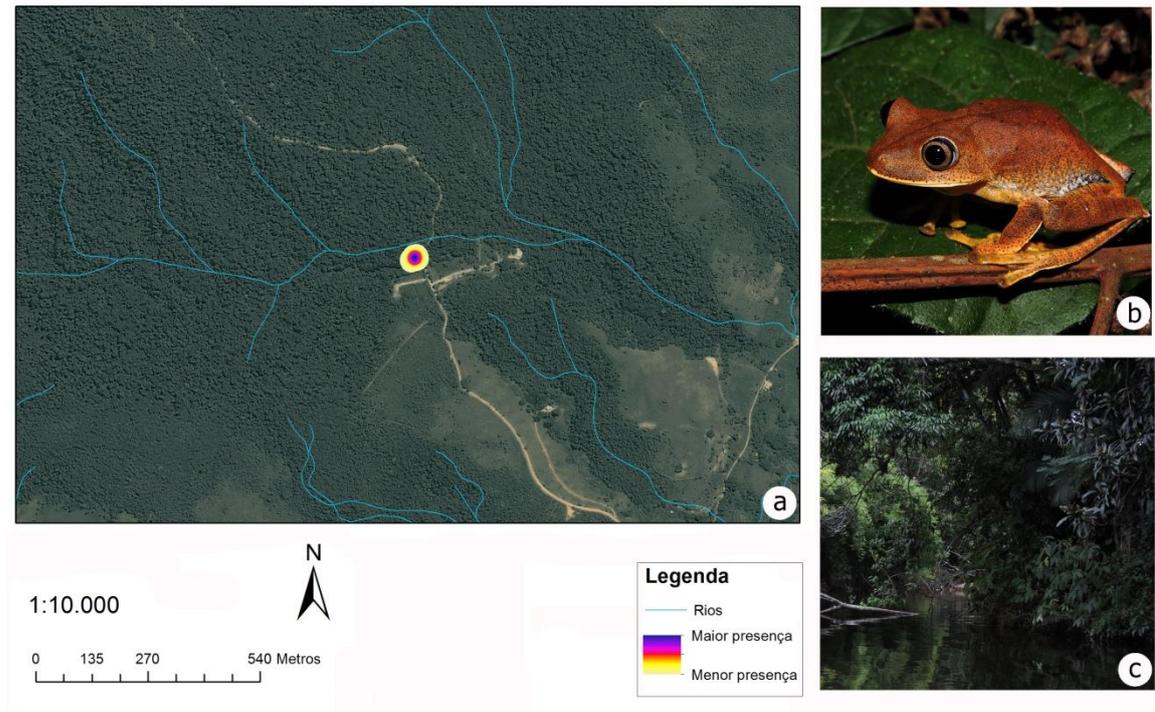


Figura 25: Mapa de calor da espécie *Hypsiboas semilineatus*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Phyllomedusa burmeisteri (Anura: Phyllomedusidae)

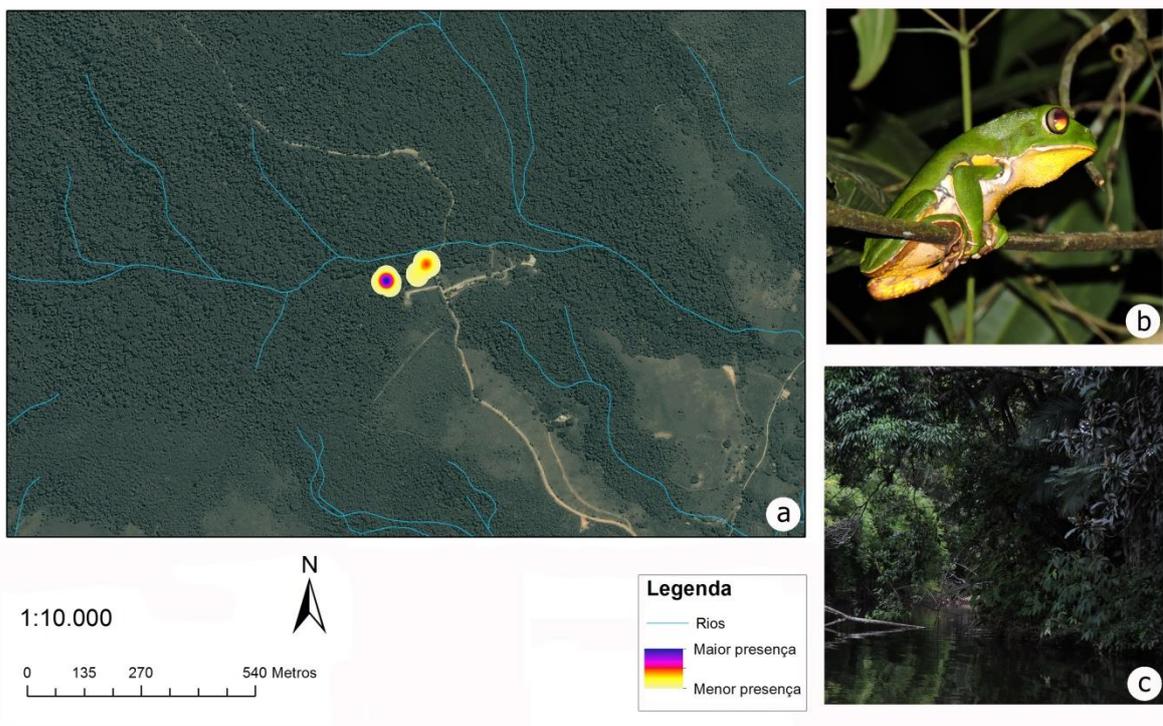


Figura 26: Mapa de calor da espécie *Phyllomedusa burmeisteri*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Pithecopus rohdei (Anura: Phyllomedusidae)

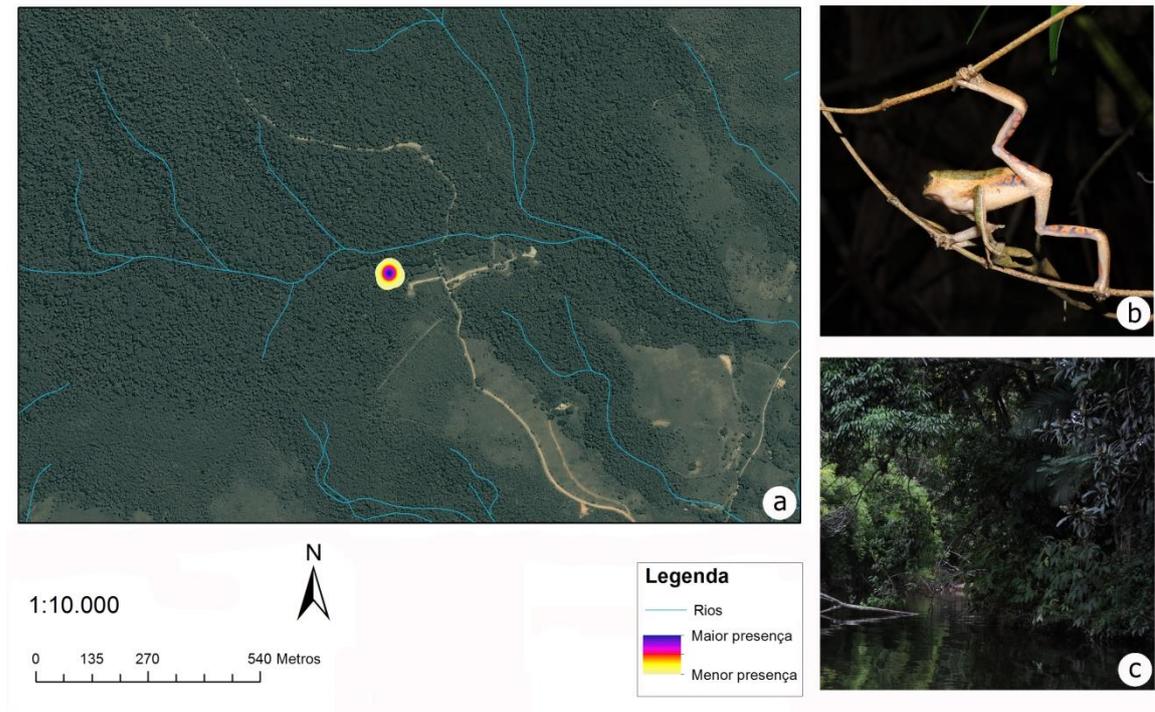


Figura 27: Mapa de calor da espécie *Pithecopus rohdei*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Scinax cardosoi (Anura: Hylidae)

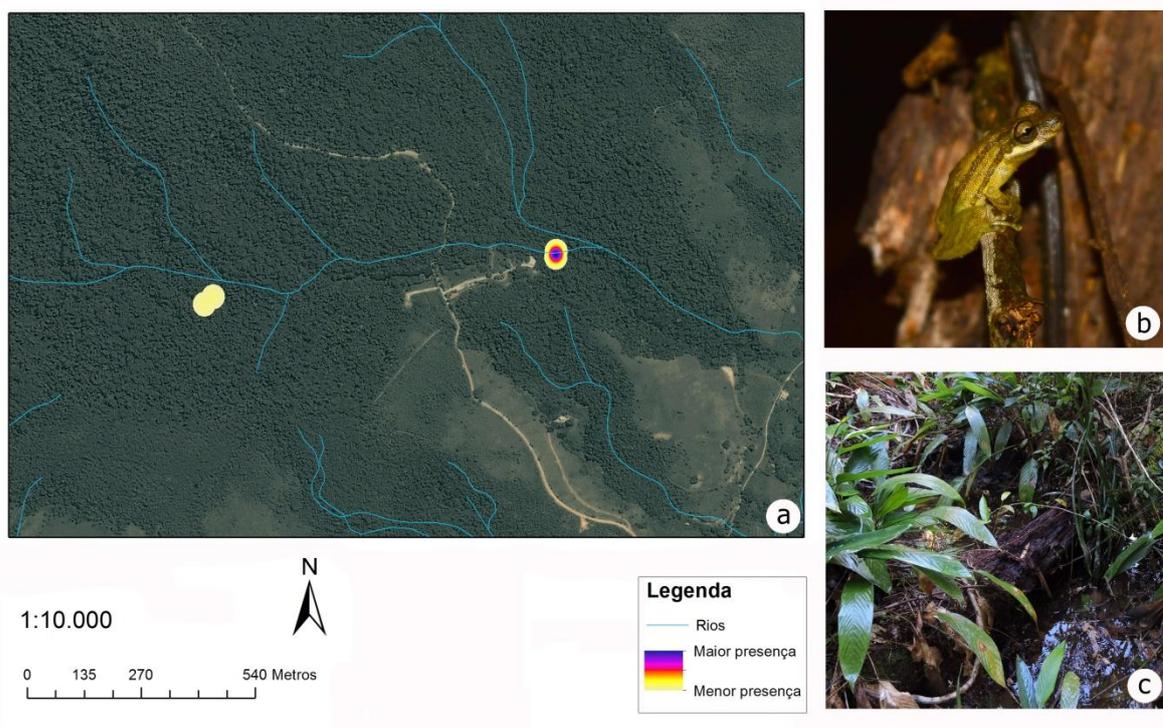


Figura 28: Mapa de calor da espécie *Scinax cardosoi*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Scinax crospedospilus (Anura: Hylidae)

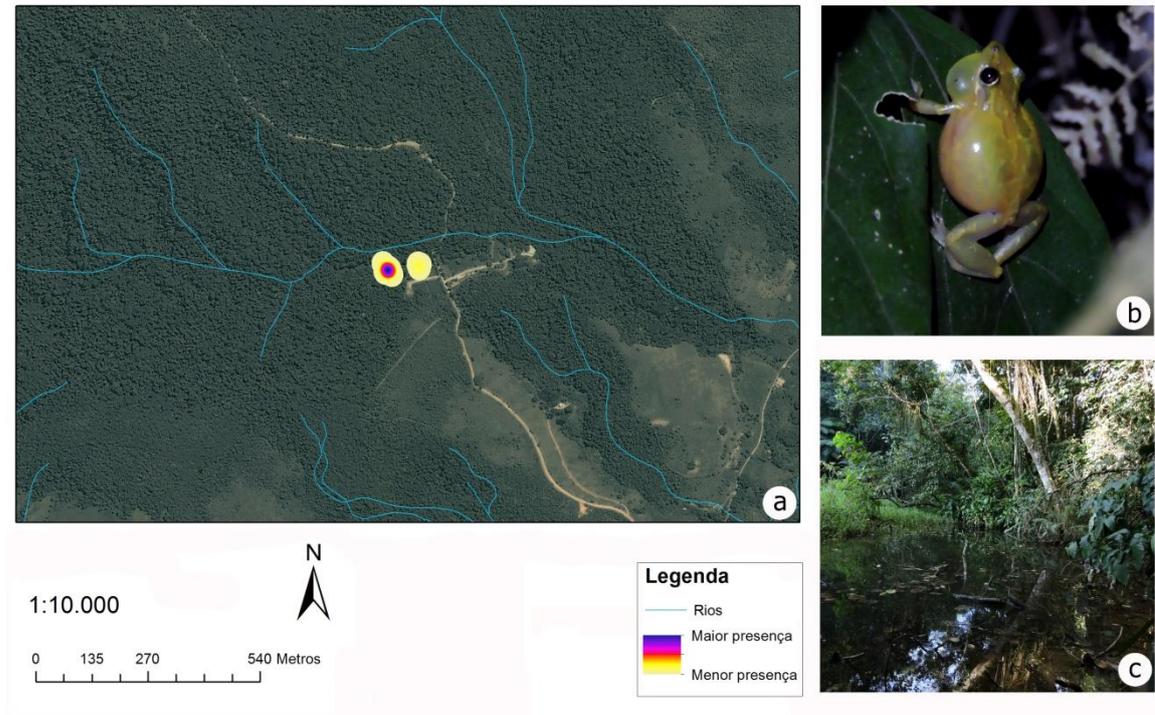


Figura 30: Mapa de calor da espécie *Scinax crospedospilus*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Scinax hayii (Anura: Hylidae)

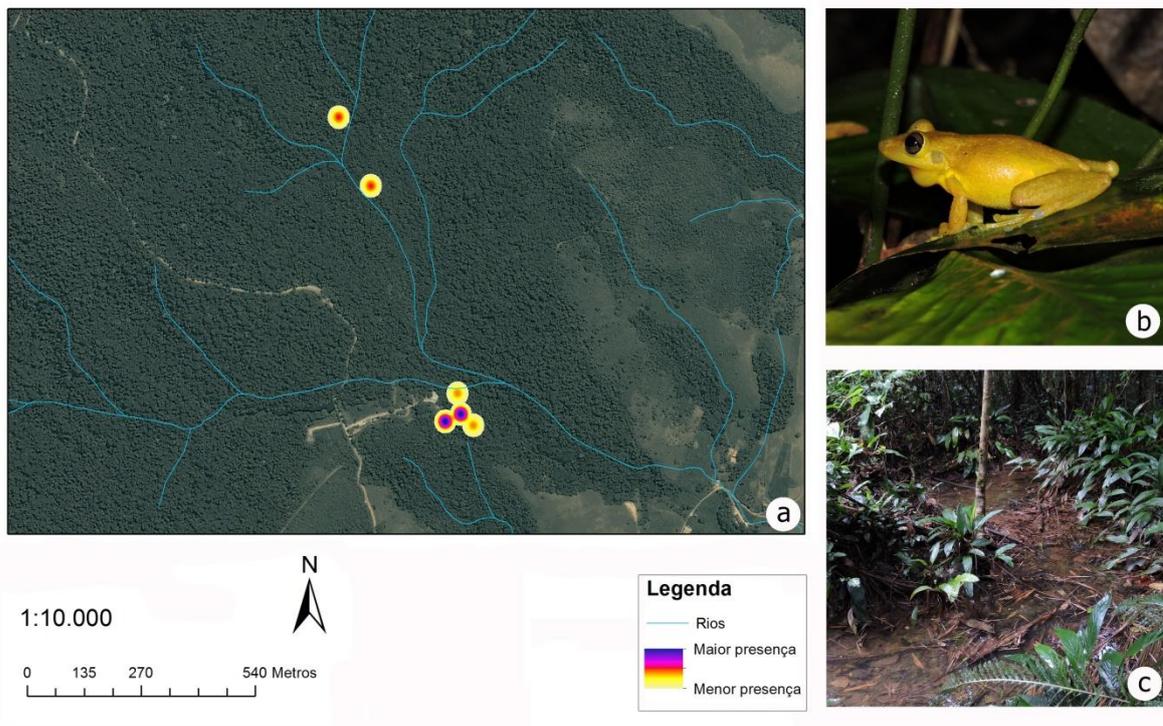


Figura 31: Mapa de calor da espécie *Scinax hayii*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Ololygon obtriangulata (Anura: Hylidae)



Figura 32: Mapa de calor da espécie *Ololygon obtriangulata*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Hylodes aff. sazimai (Anura: Hylodidae)

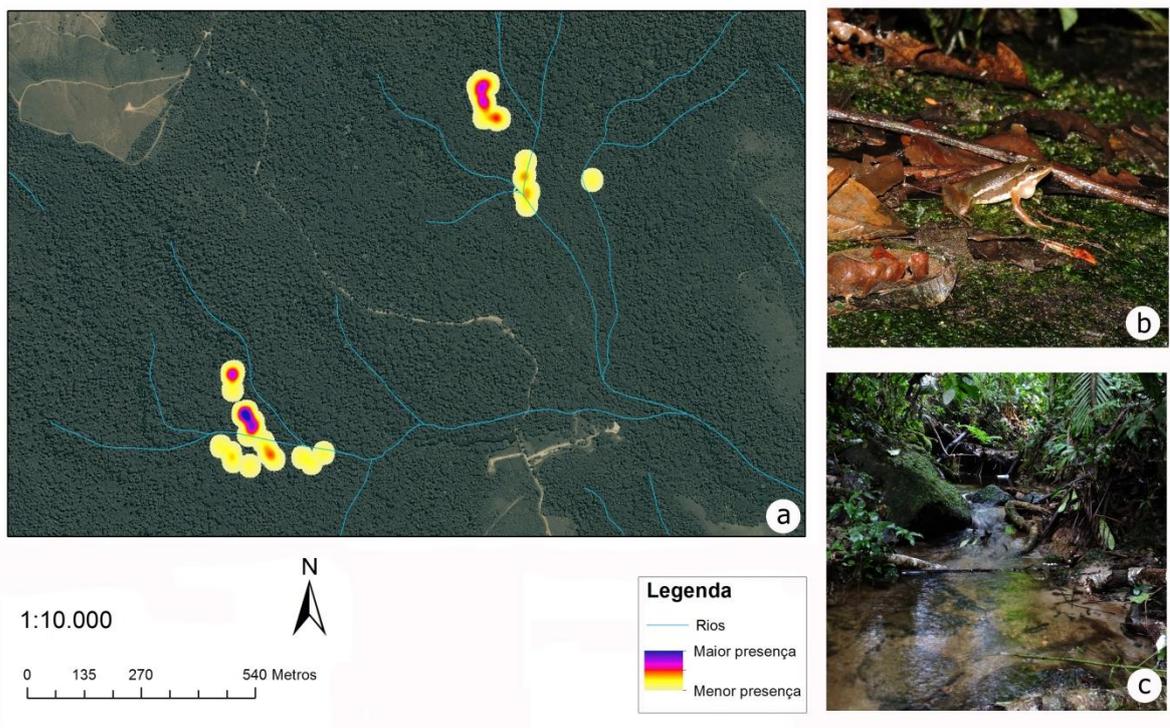


Figura 33: Mapa de calor da espécie *Hylodes sazimai*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Adenomera marmorata (Anura: Leptodactylidae)

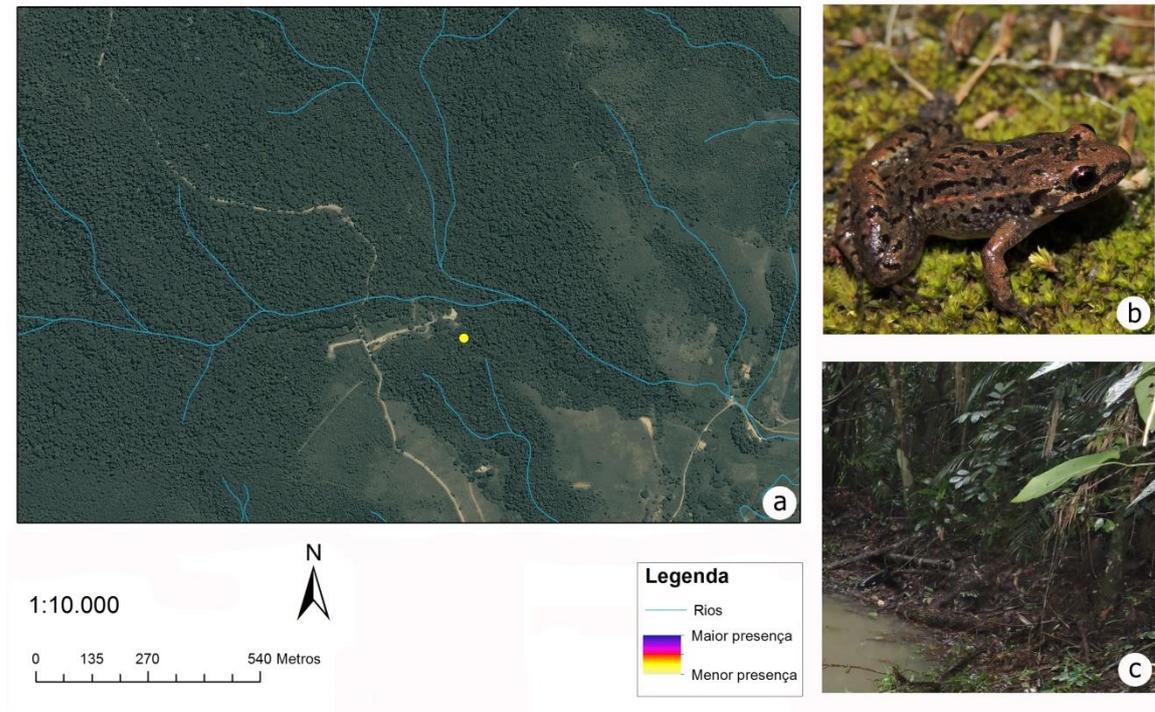


Figura 34: Mapa de calor da espécie *Adenomera marmorata*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Leptodactylus fuscus (Anura: Leptodactylidae)

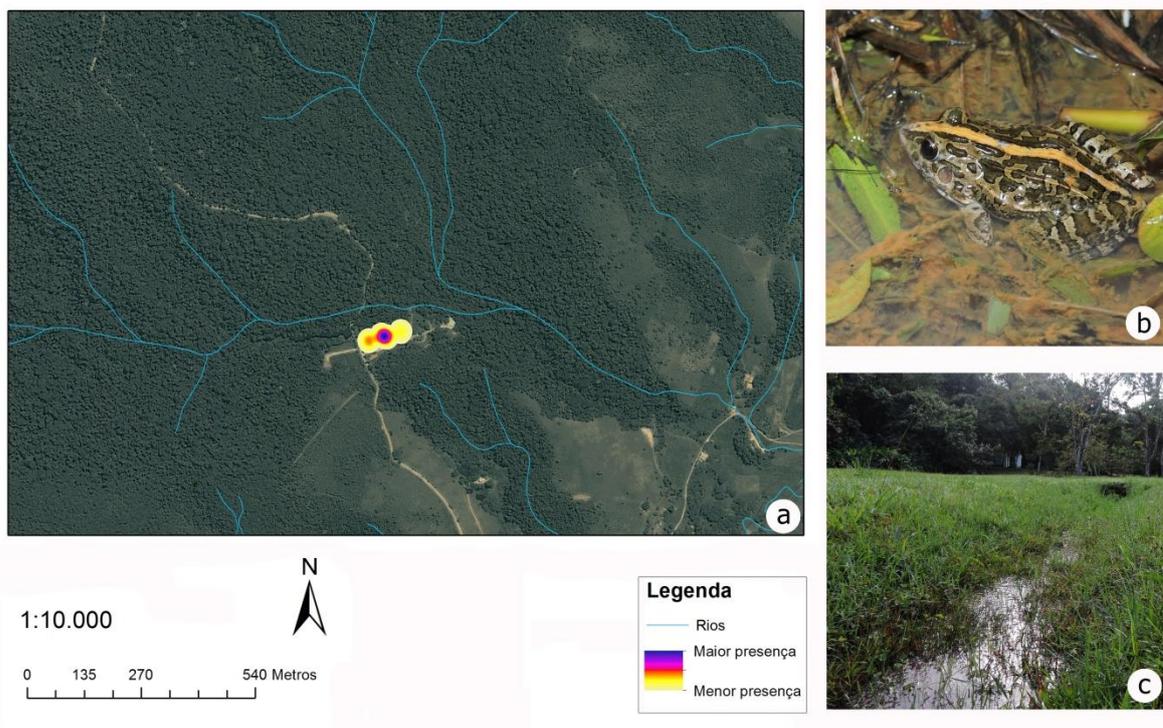


Figura 35: Mapa de calor da espécie *Leptodactylus fuscus*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Leptodactylus latrans (Anura: Leptodactylidae)

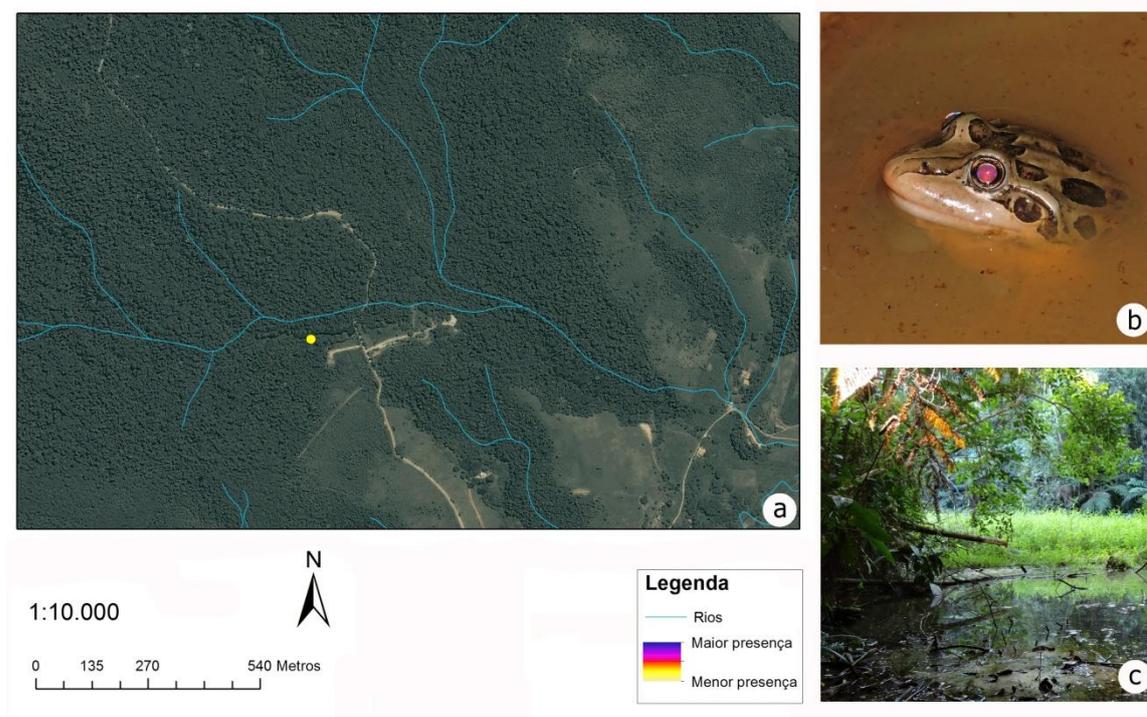


Figura 36: Mapa de calor da espécie *Leptodactylus latrans*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Physalaemus olfersii (Anura: Leptodactylidae)

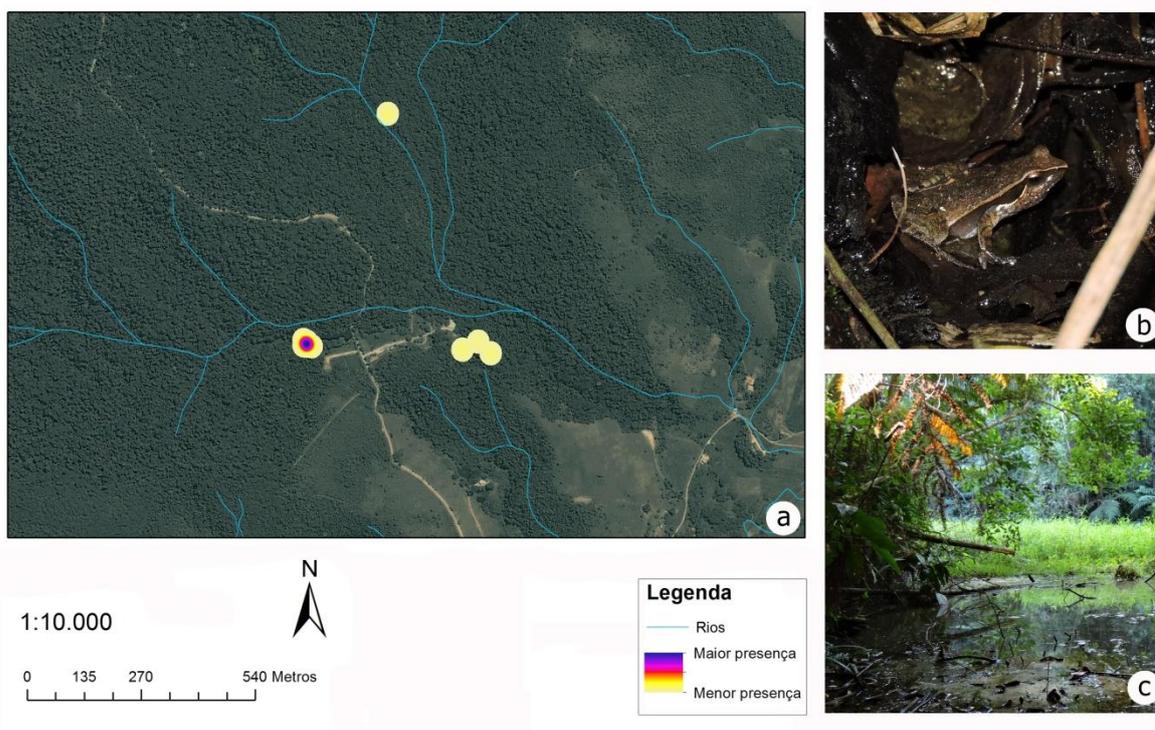


Figura 37: Mapa de calor da espécie *Physalaemus olfersii*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Chiasmocleis mantiqueira (Anura: Microhylidae)

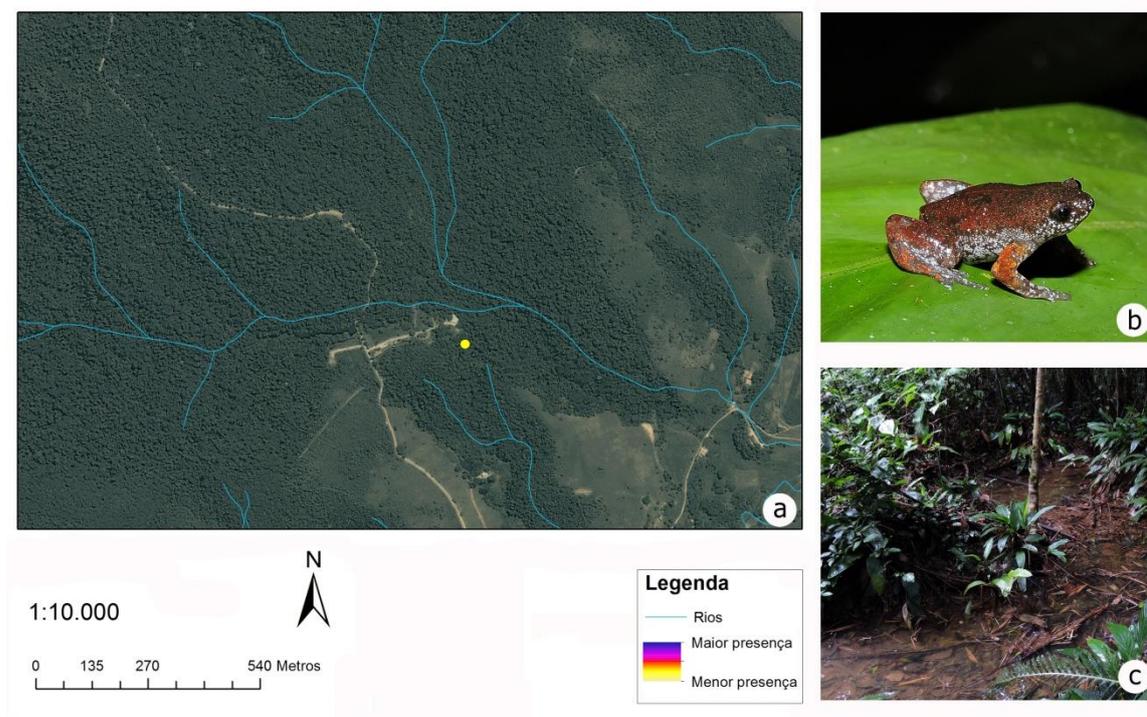


Figura 38: Mapa de calor da espécie *Chiasmocleis mantiqueira*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

Elachistocleis cesarii (Anura: Microhylidae)

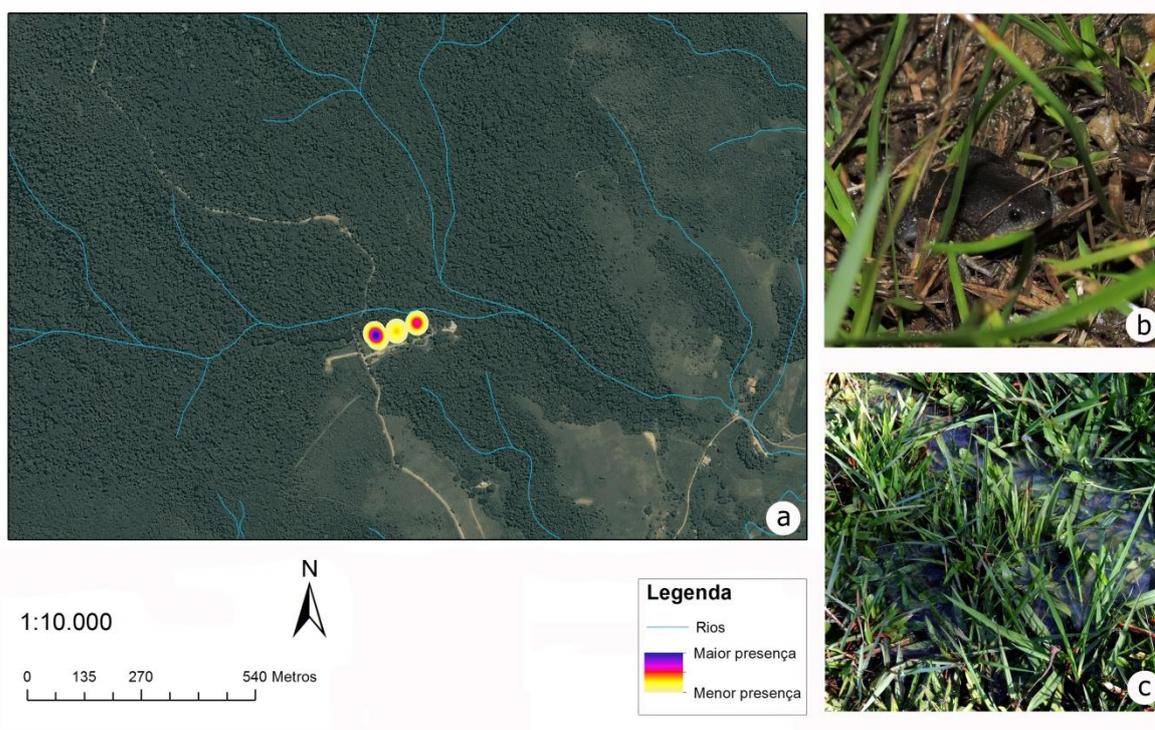


Figura 39: Mapa de calor da espécie *Elachistocleis cesarii*. (a) Representa o mapa de calor indicando a distribuição das espécies ao longo do PNMAR; (b) indica o sítio de vocalização utilizado para a espécie; (c) indica o habitat do PNMAR em que a espécie é encontrada.

5.3 Distribuição temporal

Das 33 espécies registradas no PNMAR, 28 espécies foram encontradas em atividade de vocalização (Tabela 3). *Hylodes sazimai* foi a única espécie que vocalizou durante o ano todo, as outras espécies apresentaram vocalização sazonal, com o maior número de espécies vocalizando principalmente nos períodos de setembro a fevereiro (Figura 40 e 41), quando as temperaturas se mostraram em média mais elevadas. A espécie *Ololygon obtriangulata* vocalizou apenas nas estações frias do ano. *Brachycephalus ephippium* e *Hylodes sazimai* vocalizaram exclusivamente durante o dia, o resto das espécies presentes iniciavam o turno no início da noite, por volta das 18:00 horas.

Tabela 3: Distribuição temporal e riqueza das espécies em atividade de vocalização pelos meses de amostragem (Agosto de 2015 a julho de 2016). *espécies que não foram encontradas vocalizando.

Família/Espécies	2015			2016								
	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.
Brachycephalidae												
<i>Brachycephalus ephippium</i>												
<i>Ischnocnema</i> . aff. <i>guentheri</i>												
<i>Ischnocnema</i> . aff. <i>verrucosa</i>												
Bufonidae												
<i>Rhinella icterica</i> *												
<i>Rhinella ornata</i>												
Craugastoridae												
<i>Haddadus binotatus</i>												
Hylidae												
<i>Aplastodiscus arildae</i>												
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>												
<i>Bokermannohyla circumdata</i> *												
<i>Bokermannohyla luctuosa</i>												
<i>Dendropsophus elegans</i>												
<i>Dendropsophus sanborni</i>												
<i>Hypsiboas faber</i>												
<i>Hypsiboas pardalis</i>												
<i>Hypsiboas prasinus</i>												
<i>Hypsiboas semilineatus</i>												
<i>Ololygon obtriangulata</i>												
<i>Scinax cardosoi</i>												
<i>Scinax crospedospilus</i>												
<i>Scinax hayii</i>												
<i>Scinax fuscovarius</i> *												
Hyloidae												
<i>Hylodes</i> aff. <i>sazimai</i>												

Família/Espécies	2015			2016								
	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.
Leptodactylidae												
<i>Adenomera marmorata</i>												
<i>Leptodactylus fuscus</i>												
<i>Leptodactylus labyrinthicus*</i>												
<i>Leptodactylus latrans</i>												
<i>Leptodactylus mystacinus*</i>												
<i>Physalemus olfersii</i>												
Microhylidae												
<i>Chiasmocleis mantiqueira</i>												
<i>Elachistocleis cesarii</i>												
Odontophrynidae												
<i>Proceratophrys boiei</i>												
Phyllomedusidae												
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>												
<i>Pithecopus rohdei</i>												
Total	7	12	19	18	22	21	12	5	3	3	6	5

As análises de regressão linear simples mostraram que houve associação positiva entre a riqueza de espécies amostradas ao longo dos meses e todos os fatores abióticos, porém apenas a temperatura média ($p=0,053$, $r_s= 0,32$) e máxima mensal ($p=0,005$, $r_s= 0,56$), apresentaram resultados significativos ($p<0,05$). A pluviosidade e a temperatura mínima mensal não estiveram relacionadas com a riqueza de espécies encontradas mensalmente ($p=0,536$, $r_s=0,06$; $p= 0,253$, $r_s=0,13$, respectivamente) (Figura 42).

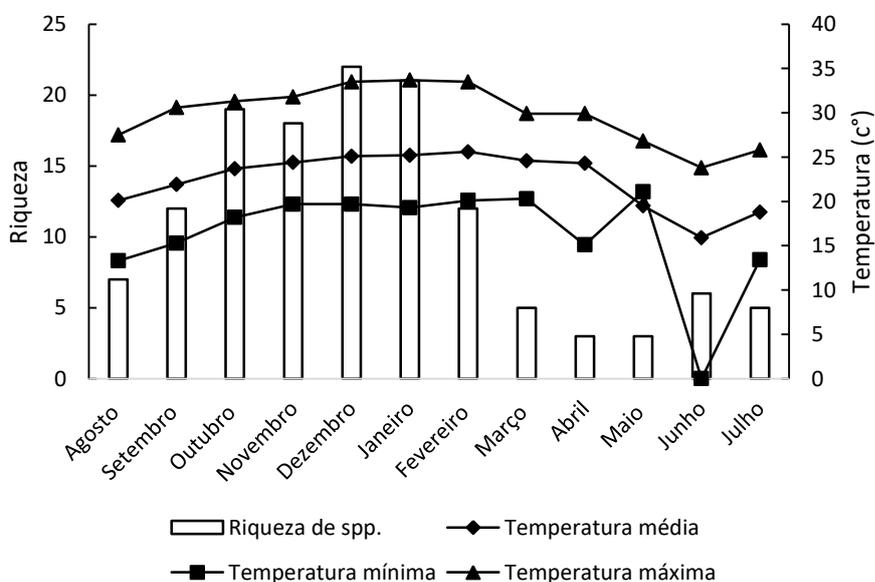


Figura 40: Temperaturas: mínima (°C), média (°C) e máxima (°C) mensais registradas entre os meses de agosto de 2015 a julho de 2016 e o número de espécies registradas no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, São José dos Campos, São Paulo.

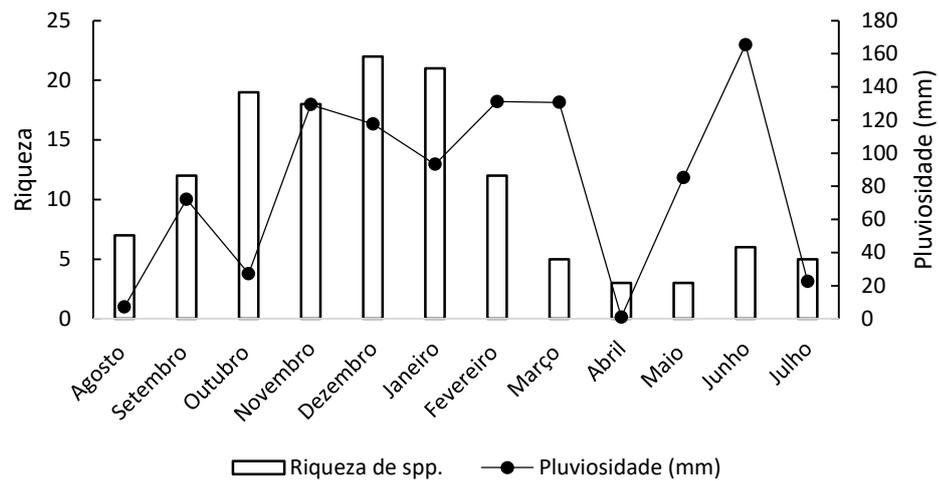


Figura 41: Pluviosidade total mensal (mm) acumulado entre os meses de agosto de 2015 a julho de 2016 e o número de espécies registradas no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, São José dos Campos, São Paulo.

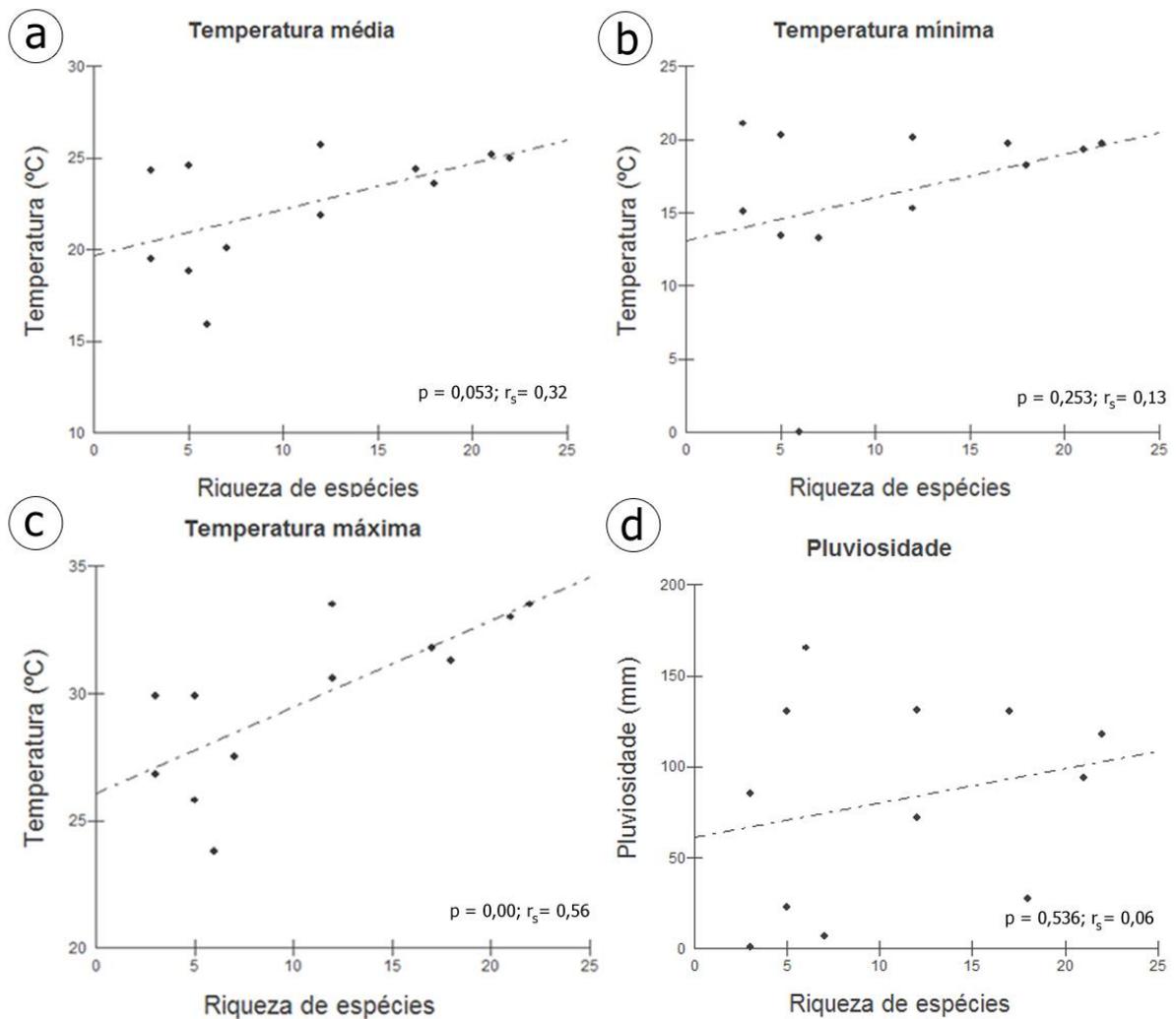


Figura 42: Análises de regressão linear simples. (a) Temperatura média mensal x riqueza de espécies; (b) temperatura mínima mensal x riqueza de espécies; (c) temperatura máxima mensal x riqueza de espécies; (d) pluviosidade x riqueza de espécies.

5.4 Análise molecular do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

Foram coletadas 101 amostras pertencentes a 24 espécies, distribuídos em 18 gêneros pertencentes a nove famílias: Brachycephalidae (n=2), Bufonidae (n=1), Craugastoridae (n=1), Hylidae (n=12), Hylodidae (n=1), Leptodactylidae (n=3), Microhylidae (n=1), Odontophrynidae (n=1) e Phyllomedusidae (n=2). Das 24 espécies de anuros amostradas para *Bd* foram identificados 10 modos reprodutivos segundo Haddad et al. (2013) (Tabela 4). Das 33 espécies encontradas, nove não tiveram amostras biológicas coletadas, devido ao baixo número de agregados populacionais no PNMAR ou pelo dia de coleta de amostra de uma determinada espécie ter coincido (*Ischnocnema* aff. *verrucosa*, *Rhinella icterica*, *Bokermannohyla circumdata*, *Hypsiboas semilineatus*, *Scinax fuscovarius*, *Leptodactylus labyrinthicus*, *Leptodactylus latrans*, *L. mystacinus* e *Chiasmocleis mantiqueira*).

Tabela 4: Lista de espécies e suas respectivas famílias que estiveram presentes no estudo. Coluna “Positivos/Amostras” indica a quantidade de positivos que foram observados e a quantidade de amostras coletadas de cada espécie. Status de conservação segundo a *RedList* da *International Union For Conservation of Nature* (IUCN), onde LC: Least concern (Pouco preocupante) e DD: Data Deficients (Dados deficientes). A coluna “Endêmico” indica se a espécie ocorre apenas em domínio de Mata Atlântica e seguiu classificação proposta por Haddad et al., 2013, assim como a coluna “Modo Reprodutivo”.

Família/Espécies	Status de conservação		Positivos/Amostras	Modo reprodutivo
	IUCN	Endêmico		
Brachycephalidae				
<i>Brachycephalus ephippium</i>	LC	Sim	0/4	23
<i>Ischnocnema</i> aff. <i>guentehri</i>	LC	Sim	0/3	23
Bufonidae				
<i>Rhinella ornata</i>	LC	Sim	0/2	1/2
Craugastoridae				
<i>Haddadus binotatus</i>	LC	Sim	0/4	23
Hylidae				
<i>Aplastodiscus arildae</i>	LC	Sim	0/2	5
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	LC	Sim	0/3	5
<i>Bokermannohyla luctuosa</i>	LC	Sim	0/12	2/4
<i>Dendropsophus elegans</i>	LC	Sim	0/5	1
<i>Dendropsophus sanborni</i>	LC	Não	0/1	1
<i>Hypsiboas faber</i>	LC	Sim	0/5	1/4
<i>Hypsiboas pardalis</i>	LC	Sim	0/7	4
<i>Hypsiboas prasinus</i>	LC	Sim	0/4	1
<i>Ololygon obtriangulata</i>	LC	Sim	0/13	2
<i>Scinax cardosoi</i>	LC	Sim	0/1	1
<i>Scinax crospedospilus</i>	LC	Não	0/2	1
<i>Scinax hayii</i>	LC	Sim	0/5	1

Hylodidae				
<i>Hylodes aff. sazimai</i>	DD	Sim	0/7	3
Leptodactylidae				
<i>Adenomera marmorata</i>	LC	Sim	0/3	32
<i>Leptodactylus fuscus</i>	LC	Não	0/3	30
<i>Physalaemus olfersii</i>	LC	Sim	0/3	11
Microhylidae				
<i>Elachistocleis cesarii</i>	LC	Não	0/3	1
Odontophrynidae				
<i>Proceratophrys boiei</i>	LC	Sim	0/3	1/2
Phyllomedusidae				
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	LC	Sim	0/4	24
<i>Pithecopus rohdei</i>	LC	Sim	0/2	24
TOTAL			0/101	10

Foram analisadas as 101 amostras e todas apresentaram resultados negativos para a presença de *Bd*. Devido aos resultados negativos encontrados nas análises moleculares das amostras coletadas, não foi possível traçar um padrão de contaminação de acordo com os modos reprodutivos. Todavia este resultado apresenta uma área que se encontra livre da infecção causada pelo fungo (Figura 43).



Figura 43: Após a reação de PCR, aproximadamente 10 μ L de cada amplificado foi analisado em gel de agarose 0,7%, juntamente com um DNA ladder como um padrão de tamanho de DNA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta. O resultado é considerado positivo para presença de *Bd* quando forem visualizadas bandas de amplificação de aproximadamente 300 pb, porém nesta análise não houve amplificação, o que indica um resultado negativo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Riqueza, Ocorrência e Diversidade

A riqueza de espécies de anuros registrados no PNMAR representa cerca de 45% das espécies registradas para todo o Vale do Paraíba no trecho paulista (MARTINS; GOMES, 2007), sendo que no PNMAR foi possível o primeiro registro da espécie *Scinax cardosoi* para o estado de São Paulo, acrescentando uma espécie para a lista de Rossa-feres et al. (2011). Anteriormente a distribuição da espécie era conhecida apenas Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro com registros pontuais (PINTO et al., 2009; LINARES et al., 2011; CARVALHO; MARTINS; GIARETTA, 2015). O registro da ocorrência desta espécie no PNMAR estendeu em 313 km a distribuição da localidade tipo da espécie em Teresópolis, região do Vale da Revolta (MOROTI et al., in prep.). Também foi registrado a ocorrência da espécie *Chiasmocleis mantiqueira*, que consiste em uma espécie com dados desconhecidos segundo a IUCN e a “Lista Vermelha de Espécies Brasileiras” (ÂNGULO, 2008; MMA, 2014). Esse foi o segundo registro da espécie para o estado de São Paulo, sendo o outro registro, localizado a 150 km de distância do PNMAR (GAREY et al., 2014). Esses registros demonstram a importância da conservação do PNMAR, que mesmo sendo um fragmento pequeno, possui a capacidade de suporte de espécies ainda desconhecidas para a ciência, podendo abrigar além de novos registros, espécies ainda não descritas.

A grande riqueza de espécies pode ser explicada pelo fato da área de estudo estar distribuída em diferentes fitofisionomias e apresentar uma alta heterogeneidade ambiental. A heterogeneidade do habitat é fundamental na estruturação das comunidades, uma vez que a grande diversidade de micro ambientes auxilia na menor competição por recursos, permitindo assim, que mais espécies coexistam (MORELLATO; HADDAD, 2000; TOLEDO et al., 2008; PARRIS, 2004; SANTOS et al., 2012; SILVA; CANDEIRA; ROSSA-FERES; CONTE; ROSSA-FERES, 2007; SANTOS; ROSSA-FERES; CASATTI, 2007). Além disso, a heterogeneidade para os anuros é fundamental devido à diversidade de modos reprodutivos especializados, que exigem diferentes características do habitat (HADDAD et al., 2013)

As análises de constância de ocorrência mostraram que foram encontradas um grande número de espécies raras (<15%) (Tabela 1), no entanto, dentre essas espécies, *Rhinella icterica*, *L. fuscus*, *Leptodactylus latrans*, *L. labyrinthicus*, *Scinax fuscovarius* e *Elachistocleis cesarii*, são espécies amplamente distribuídas e comuns em outros ambientes, principalmente em áreas impactadas. Encontrar a população dessas espécies em menor número pode indicar,

a sazonalidade no uso de ambientes naturais. Após a estação reprodutiva, algumas espécies podem se deslocar a diferentes ambientes em busca de recursos e se distanciarem dos sítios reprodutivos (alimento, abrigo, etc) (SILVA; ROSSA-FERES 2007).

6.2 Distribuição espacial

A compreensão dos fatores que atuam na regulação das comunidades e na distribuição das espécies são mecanismos úteis para a conservação (SILVANO; SEGALLA, 2005; BERTOLUCI et al., 2007). A realização de trabalhos que busquem compreender quais fatores regulam os padrões de distribuição e abundâncias das espécies são importantes para compreender como é determinada a diversidade local (MAGURRAN, 2011). No PNMAR a maioria das espécies utilizam ambientes florestais para reprodução (n=15), e algumas espécies, como *Bokermannohyla luctuosa*, *Scinax cardosoi*, *S. hayii*, *Hylodes sazimai*, *Chiasmocleis Mantiqueira*, *Proceratophrys boiei* e as espécies da família Brachycephalidae e Craugastoridae foram encontrados em atividade de vocalização apenas em ambientes florestais, mostrando uma provável dependência do micro clima desse macro-habitat.

A análise de agrupamento dos macro-habitats mostrou que a composição é mais similar entre área aberta e borda de mata (46,7%), com espécies estritamente encontradas nesses macro-habitats, do que em relação a composição encontrada em área florestal (84,6% diferente). Este fato pode ser explicado devido aos ambientes de área aberta e borda de mata serem mais homogêneos em relação à área de interior de mata, que apresentam uma menor estratificação vegetal e menos micro habitats que desfavorecem diferentes modos reprodutivos. A alta heterogeneidade encontrada no PNMAR provavelmente favoreceu a riqueza de espécies encontrada e o maior número de espécies encontradas em ambientes florestais.

O mosaico de habitats propiciou uma elevada variedade de recursos (sítios de vocalização e oviposição) e de condições físicas (umidade, temperatura, formação de corpos d'água) que ocasionou a especificidade de determinadas espécies a cada ambiente (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Em relação aos micro-habitats e os cinco agrupamentos é possível determinar as condições reprodutivas de cada espécie de acordo com o habitat utilizado, por exemplo, o grupo que utilizou a serrapilheira, as espécies possuem uma independência do ambiente aquático para reprodução, devido a ausência de fase da girino e consequentemente, são dependentes apenas da umidade encontrada no chão da mata (com exceção de *Adenomera marmorata*).

6.3 Distribuição temporal

O comportamento dos anuros é influenciado por diversos fatores que estão relacionados à sazonalidade e luminosidade, que juntas influenciam na escolha por determinadas estações do ano para a reprodução de cada espécie (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Os fatores ambientais mais relacionados ao período reprodutivo dos anuros são: temperatura do ar, da água, pluviosidade, umidade relativa do ar e luminosidade (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Em regiões tropicais é observado que as espécies possuem uma preferência para reprodução principalmente na estação chuvosa (ROSSA-FERES; JIM, 1994; PRADO; UETANABARO; HADDAD, 2004), no entanto, algumas espécies podem responder de forma diferente.

No presente estudo, a maior riqueza de espécies vocalizando foi na estação chuvosa (novembro, dezembro e janeiro) e na estação que antecedeu a estação chuvosa (setembro e outubro), no entanto, a espécie *Ololygon obtriangulata* teve o início da sua estação reprodutiva no final de abril e se estendeu até julho, a época mais fria e seca do ano, apesar do alto índice pluviométrico no mês de junho (Figura 41). Este padrão demonstra um gradiente entre espécies que são típicas de épocas mais secas e frias (*O. obtriangulata*) e a maioria das espécies que vocalizam na estação quente e chuvosa (Tabela 3).

As espécies *Scinax hayii*, *S. cardosoi*, *Chiasmocleis mantiqueira* e *Elachistocleis cesarii* estiverem associadas principalmente após fortes chuvas no PNMAR, pois ocorriam a formação de poças que eram utilizadas para a reprodução. Este resultado foi similar aos encontrados em outras comunidades na região Sul e Sudeste (BERNARDE; MACHADO, 2001; TOLEDO et al., 2003; PRADO; UETANABARO; HADDAD, 2004; CONTE; ROSSA-FERES, 2006).

Apesar das análises de regressão linear terem sido positivas em relação a pluviosidade, temperaturas média, mínima e máxima mensal, apenas a temperatura máxima e média apresentaram índice de significância. Quando comparadas, a temperatura máxima mensal teve uma maior influência na riqueza de espécies vocalizando que a temperatura média ($r_s = 0,56$; $r_s = 0,32$, respectivamente). Apesar da pluviosidade não ter apresentado significância na riqueza do PNMAR, esta influencia diretamente as espécies que possuem desovas fora do ambiente aquático (Brachycephalidae, Craugastoridae e *Adenomera marmorata*) e as espécies que são dependentes da formação de poça para reprodução.

6.4 Análise molecular do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*

As análises para detecção do fungo *Bd* no PNMAR geraram resultados negativos, no entanto, são necessários novos testes para a confirmação do resultado, como por exemplo, a utilização do qPCR, que possui uma maior sensibilidade a detecção do *Bd* (LAMBERTINI et al., 2013). A ausência de um controle positivo no protocolo proposto por Lambertini et al. (2013), não possibilitou a confirmação do resultado, que até então pode ser um bom indicativo para a comunidade de anfíbios no PNMAR.

Comunidades de anfíbios presentes em lagoas localizadas em fitofisionomias distintas (uma com o dossel mais fechado e outra mais aberta) demonstram a influência do dossel na temperatura do ambiente pode ocasionar variação na dinâmica e dispersão do fungo (BECKER; ZAMUDIO, 2011). Áreas abertas apresentam uma carga de infecção menor em relação a áreas com dossel mais fechado, devido ao diferente microclima encontrado nesses ambientes (LENKER et al., 2014). Além disso, em climas temperados, ocorreu uma baixa intensidade de infecção e prevalência em meses quentes e uma alta taxa de infecção nos meses frios, onde a temperatura variou entre 0.7 e 22.0°C, o que caracteriza uma flutuação sazonal da dinâmica do *Bd* (LENKER et al., 2014). Em um estudo realizado na Austrália, foi analisado que mesmo na ausência de mortalidades e declínios contínuos, a quitridiomicose com característica endêmica pode apresentar importantes flutuações sazonais, com maior número de indivíduos mortos no frio e menos em temperaturas mais altas, o que sugere uma provável resistência de alguns indivíduos (LENKER et al., 2014).

Além do efeito da cobertura de dossel e sazonalidade descritos acima, que são fatores extrínsecos e intrínsecos respectivamente, a história natural de cada espécie de anfíbio exerceu influência na dinâmica de infecção do *Bd* (sendo esse um fator relacionado ao hospedeiro). Levando em consideração que algumas espécies se agregam durante sua época reprodutiva, há um aumento no número de indivíduos em um determinado local e o aumento no estresse causado pelos processos de acasalamento (energia gasta com vocalização, territorialidade, combate ritualísticos, entre outros) que podem interferir na imunidade do hospedeiro e assim aumentar a dispersão do fungo na comunidade (LENKER et al., 2014).

Em um estudo realizado nos Estados Unidos, foi testado se há uma relação entre a urbanização (calculada segundo a densidade da população e perturbações antropogênicas) e/ou estações do ano em relação à infecção pelo *Bd*. De acordo com a análise dos resultados, mostrou-se que o *Bd* é fortemente afetado por padrões climáticos, sendo menos preponderante em áreas impactadas, onde apresentava temperaturas mais altas e maior incidência de sol nos

fragmentos, sendo a taxa de infecção maior nas estações mais frias (Outono e inverno) onde a temperatura variou entre 14°C e 25°C, o que corroborou com dados disponíveis na literatura (BECKER; ZAMUDIO, 2011; LENKER et al., 2011; PULLEN; BEST; WARE, 2010).

Longo, Burrowes e Joglar (2010) realizaram experimentos em laboratório, infectando a espécie de Porto Rico *Eleutherodactylus coqui*, que apresenta desenvolvimento direto, hábito terrestre e é independente de recursos hídricos para reprodução. Foram simuladas e monitoradas todas as condições *ex situ* que seriam encontradas em campo para o experimento e foi observado que *E. coqui*, em condições mais secas e frias, tendem a mudar sua distribuição na floresta e se aglutinar em manchas úmidas, que conseqüentemente são áreas que propiciam o melhor desenvolvimento para o *Bd*. Além disso, o agregamento das espécies aumentou exponencialmente a carga de infecção em toda população (LONGO; BURROWES; JOGLAR, 2010), o que corrobora com os estudos de Lenker et al. (2014), que citam a questão temperatura na dinâmica e infecção do fungo e a mudança comportamental e história natural das espécies como outro fator preponderante.

Em um estudo realizado no Brasil, no município de Ubatuba, Ruggeri et al. (2015) analisaram as espécies: *Hyllodes asper*, *H. phyllodes*, e *Cycloramphus boraceiensis*, que habitam o mesmo microhabitat e são dependentes de riachos para sua reprodução. Porém, essas espécies possuem diferentes estratégias para persistir sob as variações climáticas, pois enquanto as espécies de *Hyllodes* são diurnas, as espécies de *Cycloramphus* são noturnas, ocorrendo uma variação de temperatura notável entre os períodos de atividade. De acordo com o estudo, foi observado que a carga de infecção por *Bd* foi maior em *C. boraceiensis* do que em *Hyllodes*, o que pode ser explicado devido ao fato de que espécies do gênero *Cycloramphus* possuem hábito noturno, onde a temperatura é mais baixa do que durante o dia, e essa é uma condição mais favorável ao desenvolvimento do *Bd*. Conclui-se então, que as variações dos componentes ambientais podem aumentar a vulnerabilidade do hospedeiro em relação ao *Bd* em temperaturas frias, devido a dois mecanismos: a imunossupressão e o estímulo de replicação do patógeno no ambiente (RUGGERI et al., 2015).

Conradie et al. (2011) analisaram se há uma relação entre fase larval dos anuros e a sazonalidade da infecção. Foi utilizada para o desenvolvimento do trabalho a espécie *Amietia angolensis*, da África do Sul, e foram encontrados resultados similares aos encontrados nos adultos em climas temperados, onde a infecção foi acentuada nos meses com temperaturas mais baixas. Este estudo demonstra que girinos também podem ser usados para estudar a

dinâmica sazonal da doença em anfíbios, pois apresentaram respostas a infecção similar às encontradas nos adultos.

Segundo Kriger e Hero (2007), a variação sazonal de doenças para várias espécies animais, inclusive humanos, é comum devido à diversos fatores como exigências térmicas do parasita, alterações na imunidade do hospedeiro ao longo do tempo e também a abundância e densidade dos hospedeiros no ambiente. Outro estudo cita que além das condições específicas que o *Bd* possui para seu desenvolvimento, também ocorre uma importante variação no sistema imunológico dos anuros e as defesas químicas encontradas na pele, fatores esses não muito discutidos em estudos anteriores (PEREZ, 2015). Essas características em conjunto com as condições de crescimento do fungo, são fatores fundamentais que influenciam as taxas de infecção do patógeno na natureza.

7 CONCLUSÃO

- O registro de 33 espécies de anuros no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi reforça a que mesmo em fragmentos pequenos de Mata Atlântica, ainda é possível abrigar espécies endêmicas deste bioma.
- Apesar das novas mudanças taxonômicas (DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016), a família Hylidae apresentou o maior número de espécies, o que é considerado padrão na Mata Atlântica.
- A maior parte das espécies utilizaram ambientes florestais para a reprodução, o que mostra a necessidade de conservação desses ambientes para essas espécies, uma vez que os anfíbios são animais sensíveis a alterações no meio.
- Os resultados dos mapas de distribuição aqui apresentados podem ser utilizados para o manejo da unidade de conservação Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, para a criação de estratégias de preservação dos diferentes habitat de reprodução, tanto aqueles inseridos os fragmentos florestais quanto aqueles encontrados em áreas abertas.
- Apesar das análises de regressão linear terem apresentado significância apenas para temperaturas máxima e média, a pluviosidade não deve ser descartada como um fator importante. Algumas populações podem responder consideravelmente a essa variável, uma vez que utilizam a umidade da serrapilheira e a utilização de poças temporárias, por exemplo.
- São necessários mais estudos para saber se o fungo *Bd*, já não existia na natureza anteriormente, sem ser detectado apenas. Além de estudos que comprovem as origens das linhagens do *Bd*, e sua patogenicidade, uma vez que diferentes linhagens foram encontradas na natureza e em diferentes países.
- Novos esforços devem ser direcionados a confirmação dos resultados encontrados no presente estudo, por meio de técnicas que possuem uma maior sensibilidade a detecção do fungo, uma vez que um fragmento isolado de mata, ainda pode abrigar espécies susceptíveis a essa ameaça.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, A. *Chiasmocleis mantiqueira*. IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 28 jul. 2016.

ÁVILA, R. W.; FERREIRA, V. L. Riqueza e densidade de vocalizações de anuros (Amphibia) em uma área urbana de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 887–892, 2004.

BECKER, C. G.; ZAMUDIO, K. R. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 24, p. 9893–9898, 2011.

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

BERNARDE, P. S.; MACHADO, R. A. Riqueza De Espécies, Ambientes De Reprodução E Temporada De Vocalização Da Anurofauna Em Três Barras Do Parana, Brasil (Amphibia: Anura). **Cuadernos de Herpetología**, v. 14, p. 93–104, 2001.

BERNARDE, P. S. **Anfíbios e répteis: Introdução ao estudo da herpetofauna brasileira**. 1. Ed. Curitiba: Anolisbooks, 2012. 320p.

BERTOLUCI, J. et al. Species composition and similarities among anuran assemblages of forest sites in southeastern Brazil. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 4, p. 364–374, 2007.

BLAUSTEIN, A. R. et al. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Conservation Biology**, v. 19, p. 1460–1468, 2005.

BOSCH, J. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. **Munibe**, v.16 p.56-73, 2003.

BOSCH, J.; MARTÍNEZ-SOLANO, I.; GARCÍA-PARÍS, M. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. **Biological Conservation**, v. 97, p. 331–337, 2001.

BRANNELLY, L. et al. *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural and farmed Louisiana crayfish populations: prevalence and implications. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 112, n. 3, p. 229–235, 2015.

BREWER, R. **The Science of Ecology**. 2. ed. Londres: Cengage Learnin, 1994. 773p.

CARDOSO, A. J.; ANDRADE, G. V.; HADDAD, C. F. B. Distribuição espacial em comunidades de anfibios (Anura) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.49 p.241-249, 1989.

CARNAVAL A.C, et al. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic rain forest. **EcoHealth**, v.3, n.1, p.41–48, 2006.

CARVALHO, T. R. DE; MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. The complex vocalization of *Scinax cardosoi* (Anura: Hylidae), with comments on advertisement calls in the *S. ruber* Clade. **Phyllomedusa**, v. 14, n.4, p. 127–137, 2015.

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.

CONRADIE, W. et al. Seasonal Pattern of Chytridiomycosis in Common River Frog (*Amietia angolensis*) Tadpoles in the South African Grassland Biome Seasonal pattern of chytridiomycosis in common river frog (*Amietia angolensis*) tadpoles in the South African Grassland Biome. **African Zoology**, v. 46, n.4, p. 95–102, 2011.

CONTE, C. E.; ROSSA-FERES, D. D. C. Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 162–175, 2006.

CONTE, C. E.; ROSSA-FERES, D. DE C. Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros em um remanescente de Floresta de Araucária no sudeste do Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, n.4, 2007.

DAJOS, R. **Ecologia Geral**. 3 ed. São Paulo: Vozes EDUSP, 1978. 474p.

DASZAK, P. et al. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 6, p. 735–748, 1999.

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

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4104, n.1, p. 001-109, 2016.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. 2ed. Baltimore and London: McGraw-Hill, 1994. 670p.

DUELLMAN, W.E.; PYLES R.A. Acoustic resource partitioning in anuran communities. **Copeia**, v.1983, p.639–649, 1983.

ERNST, R.; RÖDEL, M. O. Anthropogenically induced changes of predictability in tropical anuran assemblages. **Ecology**. v.86, p.3111–3118, 2005.

ERNST, R.; RÖDEL, M. O. Patterns of community composition in two tropical tree frog assemblages: separating spatial structure and environmental effects in disturbed and undisturbed forests. **Journal Tropical Ecology**, v.24, p.111-120, 2008.

ETEROVICK, P. C. Distribution of anuran species among montane streams in south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.19, n.3, p.219–228, 2003.

EWERS, R.M.; DIDHAM, R.K. Pervasive impact of large-scale edge effects on a beetle community. **PNAS**, v.105, p.5426–5429, 2008.

FARRER, R. A. R. et al. Multiple emergences og genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 46, p. 18732–18736, 2011.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 2–9, 2007.

FISHER M. C., WALKER S.F., GARNER T. W. J. The global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in space, time, and host. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.291–310, 2009.

FITES, J. S. et al. The Invasive Chytrid Fungus of Amphibians Paralyzes Lymphocyte Responses. **Science**, v. 342, p. 366–369, 2013.

FROST, D. R.. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.> American Museum of Natural History, New York, USA. Acesso em: 28 jul. 2016.

GAREY, M. V. et al. Anurans from the Serra da Bocaina national park and surrounding buffer area, southeastern Brazil. **Check List**, v. 10, n. 2, p. 308–316, 2014.

GARNER T.W.J.; STEPHEN I.; WOMBWELL E.; FISHER M.C. The amphibian trade: bans or best practice. **EcoHealth** v.6, p.148–151, 2009.

GOWER, D. J. et al. High prevalence of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) across multiple taxa and localities in the highlands of Ethiopia. **Herpetological Journal**, v. 22, n. 4, p. 225–233, 2012.

GREENSPAN, S. E. et al. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via a bullfrog (*L. catesbeianus*) vector. **Journal of wildlife diseases**, v. 48, n. 3, p. 575–82, 2012.

HADDAD, C.F.B. et al. **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. 1. ed. São Paulo: Anolisbooks, 2013. 544p.

HEYER, W. R.; DONNELLY, M. A.; MCDIARMID, R. W. **Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians**. 1. ed. Londres: Smithsonian Books, 1994.

HYATT, A. D. et al. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, p. 175–192, 2007.

JENKINSON, T. S. et al. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. **Molecular Ecology**, v.25, n.13, p.2978–2996, 2016.

JOHNSON P. T J, LUNDE K.B., RITCHIE, E.G., LAUNER, A. E. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. **Science**, v.284, p.802-804, 1999.

KILPATRICK A.M., BRIGGS C.J., DASZAK P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. **Trends Ecology Evolution**, v.25, p. 109–118, 2009.

KRIGER, K. M.; HERO, J. M. Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. **Journal of Zoology**, v. 271, n. 3, p. 352–359, 2007.

LAMBERTINI, C., et al. Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. **Elsevier**, v.20, p. 15-21, 2016.

LAMBERTINI, C. et al. Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetologia Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 12–17, 2013.

LENKER, M. et al. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection dynamics vary seasonally in upstate New York, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 111, n. 1, p. 51–60, 2014.

LINARES, A. M. et al. Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax cardosoi* (Carvalho e Silva and Peixoto, 1991): Distribution extension. **Check List**, v. 7, n. 4, p. 407–408, 2011.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219–227, 1999.

LONGO, A. V.; BURROWES, P. A.; JOGLAR, R. L. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 2-3, p. 253–260, 2010.

MAGURRAN, A. **Ecological diversity and its measurement**. 1. ed. New Jersey: Princeton University, 1988. 179p.

MARTINS, I. A.; GOMES, F. B. R. **Biologia e a Geografia do Vale do Paraíba: Trecho paulista**. 1. ed. São José dos Campos: IEPA, 2007. 120p

MMA. ICMBio Portaria nº 43, de 31 de janeiro de 2014. Lista das Espécies consideradas com Dados Deficientes (DD). Brasil: **Diário Oficial da União**, em 31 de janeiro de 2014.

MORELLATO, L.P.C.; HADDAD C.F.B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v.32, p.786–92, 2000.

MORELLI, A.F., F. CAVALHEIRO, M. ALVES; M. FANTIN. **Representação espacial da cobertura vegetal natural original do município de São José dos Campos (SP)**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Campus Jataí – UFG. Acesso em: 1 maio 2016.

MOROTI, M. et al. Anura do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, São José dos Campos, São Paulo, Brasil. **The Field Museum**, v.1, n.733, 2016.

OLSON, D. H. et al. Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 747–749, 2013.

PARRIS M.J.; CORNELIUS T.O. Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. **Ecology**, v.85, p.3385-3395, 2004.

PEREZ, R. G. **A closer look: Seasonality patterns of skin peptides and microhabitat temperatures in surviving *Colostethus panamensis* after disease outbreak in Panama.** Dissertação (Doutorado em Ciências da Natureza) - New Mexico Institute Of Mining And Technology, Novo México, 2015

PINTO, F. C. DE S. et al. Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax cardosoi* Carvalho-e-Silva and Peixoto, 1991: Distribution extension and new state records. **Check List**, v. 5, n. 4, p. 866–868, 2009.

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 Jr., J.P. Distribuição espacial e temporal de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.57, p.583-594, 1997.

PRADO, C. P. de A.; M. UETANABARO; C. B. F. HADDAD. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitats use by anurans (Amphibia) in seasonal enviromental in the Pantanal, Brazil, Amphibia-Reptilia, **Leiden**, v.26, p.1-11, 2004.

PULLEN, D.K.; BEST, A.; WARE, J. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence is correlated with season and not urbanization in central Virginia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 1, p. 9–16, 2010.

RAMSEY, J. P. et al. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3981–3992, 2010.

ROSSA-FERES, D. C. et al. Anfíbios do Estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e perspectivas. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 0–19, 2011.

ROSSA-FERES, D. DE C.; JIM, J. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.2, p.439 - 454, 2001.

ROSSA-FERES, D. C., et al. **Herpetofauna: Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo. São Paulo**. 1. ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008. 248p.

ROSSA-FERES, D. C.; JIM, J. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, v.54, p.323:334, 1994.

ROWLEY, J. J. L.; ALFORD, R. A. Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.77, n.1, p.1–9, 2007.

RUANO-FAJARDO, G.; TOLEDO, L. F.; MOTT, T. Jumping into a trap: high prevalence of chytrid fungus in the preferred microhabitats of a bromeliad-specialist frog. **Diseases of Aquatic Organisms**, 121(3), 223-232. 2016.

RUGGERI, J. et al. Seasonal Variation in Population Abundance and Chytrid Infection in Stream-Dwelling Frogs of the Brazilian Atlantic Forest. **Plos One**, v. 10, n. 7, 2015.

SANTANA, D.J., São-Pedro, V.A., Costa, H.C., Feio, R.N. Amphibia, Anura, Hylidae, *Osteocephalus lepreurii*: Distribution extension. **Check List**. v.4, n.4, p. 453-454, 2008.

SANTANA, D. J. et al. A new species of *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Salamandra**, v. 48, n. 4, p. 187–192, 2012.

SANTOS, T.G., ROSSA-FERES, D.C., CASATTI, L. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. **Iheringia** v.97, p.37-49, 2007.

SBH. Sociedade Brasileira De Herpetologia: Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis. <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 20 out.2016.

SCOFIELD, G.B., C.C. SANTOS, N.J. FERREIRA & M.P.P.M. JORGE. Caracterização do clima da cidade de São José dos Campos. In: XI Congresso Brasileiro de Meteorologia, **Anais XI CBM Rio**, 2000, Rio de Janeiro. p. 724-729.

SCHLOEGEL, L. M. et al. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 21, p. 5162–5177, 2012.

SILVA, A.F. **Composição florística e estrutura fitossociológica do estrato arbóreo da Reserva Florestal Professor Augusto Ruschi**. Dissertação (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SILVA, F.R., CANDEIRA, C.P., ROSSA-FERES, D.D. Dependence of anuran diversity on environmental descriptors in farmland ponds. **Biodiversity and Conservation**, v.21, n.6, p.1411-1424, 2012.

SILVA, F. R. DA; ROSSA-FERES, D. D. C. Uso de fragmentos florestais por anuros (Amphibia) de área aberta na região noroeste do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 0–0, 2007.

SILVANO D.L., SEGALLA M.V. Conservation of Brazilian amphibians. **Conservation Biology**, v.19, p.653–658, 2005.

SKERRATT, L. F. et al. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **EcoHealth**, v. 4, n. 2, p. 125–134, 2007.

STUART, S. N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783–1786, 2004.

TOLEDO, L. F., BRITTO, F. B., ARAÚJO, O. G. S., GIASSON, L. O. M, HADDAD, C. F. B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. South American **Journal of Herpetology**, v.1, n.3, p.185-191, 2006.

TOLEDO, L. F.; RIBEIRO, R. S.; HADDAD, C. F. B. Anurans as prey: An exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. **Journal of Zoology**, v. 271, n.2, p.170–177, 2007.

TOLEDO, L. F., BRITO, S. P., MILSON, W. K., ABE, A. S. & ANDRADE, D. V. Effects of season, temperature, and body mass on the standard metabolic rate of Tegu Lizards (*Tupinambis merianae*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v.81, n.2, p.158-164, 2008.

TOLEDO, L. F.; ZINA, J.; HADDAD, C. F. B. Distribuição Espacial e Temporal de uma Comunidade de Anfíbios Anuros do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. **Holos Environment**, v. 3, n. 2, p. 136–149, 2003.

VALENCIA-AGUILAR, A. et al. Chytrid fungus acts as a generalist pathogen infecting species-rich amphibian families in Brazilian rainforests. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.114, n.1, p.61-67, 2015

VASCONCELOS, T. S.; SANTOS, T. G.; ROSSA-FERES, D. C. & HADDAD, C. F. B. Influence of the environmental heterogeneity of breeding ponds on anuran Assemblages from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Zoology**. v.87, p.699-707, 2009.

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

WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians**. 1. ed. Chicago: University of Chicago Press, 2007. 655p.

WERNER, E. E.; SKELLY, D. K.; RELYEA, R. A. & YUREWICZ, K. L. Amphibian species richness across environmental gradients. **Oikos**. v.116, p.1697- 1712, 2007.

WOGEL, H., P. A. ABRUNHOSA, AND J. P. POMBAL Jr. Atividade reprodutiva de *Physalaemus signifer* (Anura, Leptodactylidae) em ambiente temporário. **Iheringia**, v.922, p.57–70, 2002.

YOUNG, B. E., STUART S. N., CHANSON J. S., COX, N. A., BOUCHER, T. M. Disappearing jewels: the status of New World amphibians. **Nature**, 2004.

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.