

A INFLUÊNCIA DO FUNGO QUITRÍDIO NA VOCALIZAÇÃO DE *DENDROPSOPHUS MINUTUS*.

Palavras-Chave: BIOACÚSTICA, COMPORTAMENTO REPRODUTIVO, *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

Autores(as):

LETÍCIA LESSIO COSSOLINI, IB – UNICAMP

MSc. JOÃO PEDRO BOVOLON, LaHNAB, IB - UNICAMP

Prof. Dr. LUÍS FELIPE TOLEDO (orientador), LaHNAB, IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O repertório vocal de anuros é dividido de acordo com o contexto social: reprodutivo, agressivo, defensivo e de alimentação (Toledo *et al.*, 2015; Köhler *et al.*, 2017). Durante seu período reprodutivo, a comunicação acústica é fundamental, tanto para atrair fêmeas quanto para manter outros machos distantes na defesa de território (Haddad, 1987). A vocalização de anuros pode variar em aspectos temporais como a duração do canto, quantidade de notas, pulso e dos intervalos entre estes (Gerhardt, 1991; Ryan & Keddy-Hector, 1992). Também, em certas espécies ainda existe a complexidade de suas vocalizações, com variações na estrutura temporal e de frequências, podendo resultar em padrões de repetição diferentes. (Gerhardt, 1991).

Alguns fatores podem influenciar a vocalização de anuros, como o emergente fungo quitrídio (*Batrachochytrium dendrobatidis*/Bd), causador da quitridiomiose (An; Waldman, 2016). A doença é considerada como a causa mais problemática do declínio de anfíbios pelo mundo (Scheele *et al.*, 2019), tendo causado a extinção de até 200 espécies de anfíbios e tendo infectado mais de 500 ao redor do mundo (Scheele *et al.*, 2019). A infecção pode ser transmitida no contato de animal para animal, ou por contato com água contaminada, assim infectando os animais que tem seu ciclo reprodutivo nesse ambiente (Piotrowski *et al.*, 2004; Haddad *et al.*, 2013).

Dendropsophus minutus é um anuro da família Hylidae, cujo ciclo reprodutivo acontece em períodos chuvosos, quando machos são encontrados vocalizando sobre a vegetação às margens de lagoas e brejos, e seus ovos são depositados em poças, lagoas ou brejos (Toledo *et al.*, 2021). O repertório de vocalização de *D. minutus* é de grande variabilidade, incluindo três notas (A, B, C) podendo ser isoladas ou combinadas em grupos, já sendo observadas 115 combinações diferentes (Bovolon & Toledo, 2024). As fêmeas de *D. minutus* escolhem como parceiros os machos mais ativos do coro, estes sendo os que apresentam maior taxa de repetição de cantos. (Haddad, 1987).

Normalmente, anuros infectados com *Bd* apresentam um canto mais agudo, longo, e frequente do que machos saudáveis (An; Waldman, 2016; Torres, 2021). O maior investimento em vocalizações de animais infectados pode indicar a necessidade do macho de se reproduzir mais e mais cedo por conta do seu curto tempo de vida restante (An & Waldman, 2016). Para o fungo *Bd*, se a preferência de fêmeas for por machos infectados, cujo canto é mais longo e chamativo (An & Waldman, 2016), o patógeno se beneficiaria da contaminação do indivíduo fêmea no momento de reprodução, e a prole pode ser mais suscetível a infecção pelo *Bd*, causando assim o aumento da taxa de contaminação e consequentemente o declínio da população (Kelleher *et al.*, 2021).

Acredita-se que a infecção por *Bd* pode não somente afetar a sobrevivência de indivíduos de *D. minutus*, mas também seu sucesso reprodutivo, influenciando na vocalização dos machos e assim na sua atratividade para fêmeas. O presente estudo tem como objetivo investigar se a infecção por *Bd* terá influência na vocalização de *D. minutus*, como acontece com outras espécies de anuros.

METODOLOGIA:

1. Amostragem de *Bd*

A extração de DNA e o diagnóstico e quantificação de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) foi realizado através de qPCR segundo metodologia de Lambertini *et al.* (2013).

2. Bioacústica

Foram usadas as gravações (FNJV 51431-51532) disponíveis na FNJV (Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard, MDBio, Unicamp), previamente coletadas em São Paulo (Reserva Biológica da Serra do Japi, Jundiá; Parque Estadual Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, São Luiz do Paraitinga; Estação Ecológica Bananal, Bananal). Seguindo as definições de Köhler *et al.* (2017), nós consideramos e obtivemos as variáveis: duração de canto (duração de um único canto, medido do início ao fim), número de notas (subunidade principal de um canto), número de cantos (unidade acústica da vocalização; um canto é separado de outros por períodos de silêncio). Para obter essas variáveis acústicas, foi utilizado o software Raven Pro 1.6 (2023). Para a duração do canto foi utilizada a função delta time, e foram manualmente contabilizadas as variáveis de número de notas e de cantos. Os cálculos de complexidade de canto representados pelas entropias de Shannon e Taxa de entropia foram realizados seguindo a publicação de Bovolon & Toledo (2024).

3. Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software *R* (2022) onde avaliamos a influência da infecção pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) na vocalização de *Dendropsophus minutus*, assim como a influência de diferentes cargas de infecção pelo fungo. Foi utilizado o modelo linear de

regressão (*LM*), além de testes de correlação Pearson e testes de dispersão e resíduos, onde utilizou-se teste de Shapiro-Wilk para distribuição normal dos resíduos. Assim, foram utilizadas a variável preditora (carga de infecção de *Bd*) e as variáveis dependentes de vocalização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para as qPCRs realizadas, 23 amostras foram positivas para infecção por *Bd* (*Bd*⁺). No grupo *Bd*⁺, a carga média de infecção foi de 237,70. Para os *Bd* positivos, os dados de vocalização de três indivíduos (SLFT 19163, 19200 e 19173) não estavam disponíveis. Entre os casos *Bd* negativos (*Bd*⁻), faltavam os dados de quatro indivíduos. Por este motivo, a análise foi realizada com 20 indivíduos *Bd*⁺ e 59 indivíduos *Bd*⁻.

Quando o teste LM foi realizado entre indivíduos *Bd*⁻ e *Bd*⁺, a influência da infecção por *Bd* na vocalização não demonstrou influência estatística. Já entre os indivíduos infectados, a duração do canto ($p < 0,04$) e o número de notas ($p < 0,03$) foram influenciados pela carga de infecção por *Bd* (**Tabela 1**). Todos os testes de distribuição e normalidade indicaram resultados satisfatórios. Apesar de não ter alcançado relevância estatística, se observa tendência de aumento de notas C com o aumento da carga de infecção ($p \sim 0,08$).

Os resultados não significativos para a influência de infecção por *Bd* sobre o canto (Repertório, número de cantos, entropias do repertório, número de notas A, B e C) podem indicar que a influência da infecção na complexidade do repertório é limitada. Talvez a existência de outros fatores não examinados nesse projeto possa estar influenciando a complexidade do repertório desses animais, como temperatura, umidade e possivelmente outros aspectos ambientais ou biológicos podem ter um papel importante nos padrões de vocalização, como visto por Torres (2021), e Bovolon & Toledo (2024).

Tabela 1. Tabela com o número de tombo das amostras coletadas em campo e armazenadas em freezer no laboratório (SLFT = coleção de swabs do LaHNAB), resultado do teste de infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis*, e as variáveis acústicas da vocalização de *Dendropsophus minutus*. (*Bd* Load = carga de infecção por *Bd*; esh = Entropia de Shannon; emark = Taxa de entropia de Markov; ncall = número total de cantos; nnotes = número total de notas).

Indivíduo (SLFT)	<i>Bd</i> Load (ge)	Repertório	esh	emark	ncall	Nota A	Nota B	Nota C	nnotes	Duração de canto (ms)
19151	71.99	1	0.0	0	3	3	0	0	3	16
19157	122.47	2	1.0	0.5	4	0	8	10	18	1929.5
19158	4.05	4	0.2	0	26	35	0	1	36	1135
19159	426.80	3	0.9	0	15	17	2	2	21	65
19160	92.58	3	0.5	0	27	30	0	4	34	58
19161	88.96	2	0.0	0	7	15	0	0	15	1138
19162	12.77	6	1.0	0.4	14	0	16	30	46	90
19165	4.26	5	1.1	n/a	21	18	10	1	29	40

19166	196.17	5	0.2	0	10	23	0	1	24	1621
19167	51.17	11	1.3	0.6	42	42	9	50	101	75
19169	49.15	3	1.0	0	6	0	6	7	13	46
19179	133.27	1	0.0	0	30	30	0	0	30	21
19185	422.63	4	1.2	0	33	37	7	12	56	54
19186	830.07	5	1.3	0	21	42	10	18	70	2168.3
19200	278.30	11	1.4	0.4	41	27	22	62	111	80
19202	0.93	5	1.0	0	32	31	1	20	52	40
19203	615.31	14	0.7	1.0	69	119	0	31	150	87
19206	648.98	4	1.3	0	19	9	15	41	65	1122
19791	703.71	8	0.9	0.5	23	0	30	67	97	1357.8
19808	0.36	10	1.5	0.7	23	15	17	30	62	77

CONCLUSÕES:

Estudos publicados (Torres, 2021; An & Waldman, 2016) sugerem a influência positiva da infecção com a vocalização, porém a amostra *Bd*⁺ do presente estudo é pequena e o n de negativos (n⁻ = 59) é três vezes maior que o n de positivos (n⁺ = 20), podendo explicar a falta de significância estatística em algumas variáveis. Acreditamos que uma amostra maior revelaria mais resultados, e uma análise com um número mais equalizado de negativos e positivos seria mais precisa para a análise da influência da presença de *Bd* em indivíduos de *D. minutus*. E, talvez, um maior n de animais positivos mostrasse um resultado significativo para o número de notas C. A carga de infecção demonstra influência positiva na vocalização de *D. minutus* nas variáveis de duração de canto e quantidade de notas, como visto por Torres (2021).

Estes resultados estatísticos, e a possível influência da nota C, podem ser de interesse para estudos futuros que explorem melhor o impacto da saúde dos anuros no seu comportamento de canto, particularmente em contextos de conservação onde a prevalência de infecções pode alterar significativamente o comportamento e o sucesso reprodutivo do animal.

BIBLIOGRAFIA

- AN, D. & WALDMAN, B. Enhanced call effort in Japanese tree frogs infected by amphibian chytrid fungus. **Biology Letters**, v. 12, p. 20160018, 2016
- BOVOLON, J. P. & TOLEDO, L. F. *Dendropsophus minutus* repertoire complexity and its relationship with environmental traits. **Bioacustics**, p. 1-16, 2024.

- GERHARDT, H. C. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. **Animal Behaviour**, v. 42, p. 615-635, 1991.
- HADDAD, C. F. B. **Comportamento reprodutivo e comunicação sonora de *Hyla Minuta* Peters, 1872 (Amphibia, Anura, Hylidae)**. 1987. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ecologia, Campinas, 1987.
- HADDAD, C. F. B., TOLEDO, L. F. *et al.* **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. Anolisbooks, 2013.
- KÖHLER, J., *et al.* The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, v. 4251, p. 1-124, 2017.
- KELLEHER, S. R., *et al.* Disease influences male advertisement and mating outcomes in a critically endangered amphibian. **Animal Behaviour**, v. 173, p. 145-157, 2021.
- LAMBERTINI, C. *et al.* Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Herpetologia Brasileira**, v. 2(1), p. 12-17, 2013.
- Lisa K. Yang Center for Conservation Bioacoustics. 2023. Raven pro: interactive sound analysis software. Version 1.6.3. Computer software [Software]. Ithaca: The Cornell Lab of Ornithology. <http://ravensoundsoftware.com/>.
- PIOTROWSKI J. S. *et al.* Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96(1), p. 9-15, 2004.
- R Core Team. 2022. R: a language and environment for statistical computing. (4.2.2). [Software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- RYAN, M. J. & KEDDY-HECTOR, A. Directional patterns of female mate choice and the role of sensory biases. **American Naturalist**, v. 139, p. 4-35, 1992.
- SCHEELE, B. C. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, p. 1459-1463, 2019.
- TOLEDO, L. F. *et al.* The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta Ethologica**, v. 18(2), p. 87-99, 2015.
- TOLEDO, L. F. *et al.* Anfíbios da Mata Atlântica. Aplicativo de celular. Econature, Consultoria, Pesquisa e Educação Ambiental. [Software]. 2021.
- TORRES, C. I. Z. **Variação dos parâmetros acústicos e de infecção pelo fungo quitrídio em anuros num transecto elevacional no parque nacional do Caparaó**. 2021. 213 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2021.