



Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias

Edição 2011/2012

Relatório de Projeto

Influência do Ranavirus na estrutura etária de Tritões de Boscai

Bolseiro(a): Telma Laurentino

Faculdade de Ciências
Curso: Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento
Ano: 3º

Tutor(a): Prof. Rui Rebelo

Julho de 2012

Nota prévia

O presente trabalho foi primeiramente intitulado de “Influência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* na longevidade e estrutura etária de Urodelos” dado que as primeiras amostras recolhidas apontavam para uma morte dos tritões por ação desse fungo. No decorrer do estudo, as análises genéticas entretanto realizadas revelaram que o agente etiológico causador dos episódios de mortalidade foi um *Ranavirus* e não *Batrachochytrium dendrobatidis*. Assim, o trabalho foi conduzido no sentido de analisar a mesma problemática, mas tendo como objetivo compreender a influência do *Ranavirus* na estrutura etária de tritões-de-ventre-laranja. Apenas uma espécie foi analisada, uma vez que não foram capturados suficientes indivíduos da outra espécie-alvo (Tritão-marmoreado) inicialmente incluída na análise.

Enquadramento

As doenças infecciosas emergentes são reconhecidos agentes, diretos ou indiretos, de declínio e extinção de populações selvagens, atingindo atualmente uma taxa de propagação sem precedentes (Jones et al., 2008). Este flagelo tem grandes implicações biológicas. O facto de muitas espécies serem reservatórios de agentes patogénicos, e a ameaça permanente à conservação da biodiversidade global, comprometem também a saúde humana (Daszak et al., 2000). Nas últimas décadas, a introdução de agentes infecciosos tem afetado vários ecossistemas e vários grupos de animais: mamíferos, aves, e anfíbios, sendo estes últimos quem apresenta os números mais preocupantes (Stuart et al., 2004). As taxas atuais de extinção deste grupo foram estimadas em 211 vezes superiores à taxa de extinção normal das espécies (McCallum, 2007) o que torna este um dos mais marcantes e enigmáticos problemas ambientais do século XXI (Daszak et al., 1999).

Não parece haver uma causa única para os colapsos populacionais. As causas para declínios ou extinções podem diferir de região para região e mesmo de população para população (Drost e Fellers, 1996). Apesar de a causa não ser exclusiva, as doenças infecciosas são apontadas como um dos principais fatores do declínio e subsequente extinção dos anfíbios (Collins e Storfer, 2003).

Os anfíbios são hospedeiros de um vasto número de microparasitas como fungos, vírus e bactérias (Blaustein et al., 2012) e devido à ectotermia e à respiração cutânea, são especialmente sensíveis a alterações metabólicas e fisiológicas, o que os torna um grupo de risco. Em condições ambientais estáveis, o impacto destes parasitas pode ser sub-letal. No entanto, quando sob outros fatores de stresse como a fragmentação de habitat, contaminação do nicho ecológico, ou alterações climáticas, os hospedeiros ficam mais vulneráveis,

amplificando a ação dos microparasitas, o que pode resultar em mortandades e, no limite, na extinção total de uma espécie (Daszak et al., 2000). Vários estudos interdisciplinares têm, recorrentemente, apontado duas doenças emergentes como responsáveis por mortalidades massivas em populações de anfíbios: a quitridiomiose e as infecções por iridovírus (Daszak et al., 1999).

O agente etiológico da quitridiomiose é o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), detetado em todos os continentes onde existem anfíbios sendo que até 2009, 350 espécies tinham resultados positivos quando testadas para a presença de *Bd* (Fisher et al., 2009). A exposição ao *Bd* é certamente influenciada de forma complexa por características específicas da espécie e do ambiente, biótico e abiótico, o que faz com que algumas espécies sejam mais suscetíveis à infecção (Blaustein et al., 2012).

À semelhança da quitridiomiose, infecções por iridovírus, especificamente *Ranavirus*, têm sido detetadas a nível global (Chinchar e Mao, 2000; Blaustein et al., 2012). No entanto, até há 15 anos, estas foram consideradas neutrais. Estes vírus infetam adultos e larvas de anfíbios, mas a letalidade parece ser maior nos segundos (Gantress et al., 2003). Os *Ranavirus* são vírus de cadeia dupla de DNA que infetam vertebrados ectotérmicos (Gray et al., 2007) e a sua transmissão é horizontal, podendo ocorrer por exposição a água ou solos infetados ou por canibalismo de indivíduos enfermos (Harp e Petranka, 2006). Apenas após uma semana de exposição ao vírus, hemorragias sistémicas e necrose de tecidos causam insuficiência renal e hepática levando à morte do indivíduo (Gray et al., 2009).

A dinâmica das doenças no sistema hospedeiro-parasita é função dos processos biológicos de ambos, e ainda dos fatores ambientais. A exposição e subsequente infecção por *Ranavirus* são facilitadas em habitat aquático, o que sugere que, num organismo com ciclo de vida complexo como os anfíbios, as fases larvares sejam mais suscetíveis à doença (Brunner et al., 2004). No entanto, para que o parasita subsista num ambiente, tem que ter capacidade de persistir fora do seu hospedeiro o que pode ser conseguido através de outros hospedeiros-reservatório ou através de reservatórios intra-específicos por infecção sub-letal de indivíduos resistentes (Brunner et al., 2004).

Espera-se então que estas doenças se reflitam na estrutura populacional, nomeadamente na sua estrutura etária, o que é possível avaliar utilizando o método da esqueletocronologia. Os animais ectotérmicos estão sujeitos a ciclos de atividade anual discretos o que se vai traduzir em marcas de crescimento registadas no tecido ósseo. Estas marcas de crescimento representam variações na velocidade de desenvolvimento dos animais e organizam-se num

sistema repetitivo de camadas ósseas bem definidas, utilizadas na determinação da idade de vertebrados (Castanet, 1982).

As marcas de crescimento são claramente observáveis nos cortes transversais de ossos longos de anfíbios (Caetano, 1988). As linhas de paragem de crescimentos (LPC) correspondem a um período de atividade metabólica reduzida, como hibernação ou estivação, e alternam com bandas mais largas, designadas zonas, que correspondem ao período ativo do animal, quando existe maior deposição de tecido ósseo. O valor do método esqueletocronológico reside no conhecimento exato da periodicidade das marcas de crescimento, uma vez que na maior parte dos vertebrados as LPC têm periodicidade anual, existindo exceções em que se forma mais que uma LPC por ano.

Os anfíbios são uma parte importante do património natural da Serra da Estrela contribuindo significativamente para a enorme riqueza e diversidade desta área natural onde ocorrem 13 das 19 espécies recenseadas em Portugal Continental (Lesparre e Crespo, 2008). Entre estas, encontram-se vários endemismos da Península Ibérica como é o caso do tritão-de-ventre-laranja (*Lissotriton boscai*). *Lissotriton boscai* é um tritão de pequeno tamanho de corpo esbelto e alongado, que pode empreender tanto uma vida terrestre como aquática. No entanto, a sua reprodução depende sempre da água, meio ao qual está bem adaptado ocorrendo preferencialmente em águas límpidas e frescas, de corrente fraca ou inexistente (Lesparre e Crespo, 2008). O período de reprodução das populações de altitude tem início em Dezembro e as primeiras emigrações do meio aquático (após as posturas) verificam-se em Março (Caetano, 1988). No entanto, é um dos mais aquáticos urodelos portugueses e por isso pode encontrar-se dentro de água durante todo o ano, caso as condições atmosféricas o permitam (Caetano, 1988).

Em 2003 foi detetada mortalidade em massa de urodelos da espécie *Triturus marmoratus* na Serra do Gerês, confirmando-se que esta se devia a infeção por *Ranavirus* (Soares et al., 2003) tendo sido a infeção reconfirmada em 2008, e detetada também em *Lissotriton boscai* (Alves de Matos et al., 2008). Em Agosto de 2009, centenas de sapos-parteiros (*Alytes obstetricans*) foram encontrados mortos no Parque Natural da Serra da Estrela e análises genéticas e histológicas provaram tratar-se de infeção por *Bd* (Rosa et al., *in press*). Dados subsequentes apontam para o quase extermínio de *Alytes obstetricans* na Serra da Estrela e reforçam a ideia de que as populações anfíbias de elevada altitude são um grupo de risco (Rosa et al., *in press*). Estes dados juntamente com a descoberta de recentes mortalidades em massa, na mesma área, de tritões-de-ventre-laranja, menos suscetíveis à doença que o sapo-parteiro, sugerem que declínios numéricos desta ordem não se tratam de flutuações normais

ou de dinâmica metapopulacional, mas podem sim, ser indicadores de um *hotspot* de infeção.

Com o rápido colapso da biodiversidade, torna-se fulcral compreender as dinâmicas dos agentes patogénicos para que possamos avaliar corretamente os riscos e intervir tendo em vista a conservação da biodiversidade e a proteção do património natural.

Objetivos do projeto

O principal objetivo do presente trabalho é compreender a influência do *Ranavirus* na estrutura etária de uma população de tritões-de-ventre-laranja da Serra da Estrela. A compreensão da dinâmica de infeção da doença auxiliará na antevisão dos impactos do vírus na população estudada e noutras.

Metodologia

Amostragem

O trabalho de campo foi conduzido em dois locais no Parque Nacional da Serra da Estrela: Folgosinho (40°29'37.09"N - 7°31'47.61"W) e Sazes (40°20'39.70"N - 7°42'52.63"W). Ambas as áreas de estudo estão situadas a aproximadamente 1000m de altitude. Os habitats aquáticos amostrados consistem em tanques de origem antropogénica (12m² e 7m² de área, e profundidades máximas de 2.5m e 1.5m respetivamente). O esforço de amostragem consistiu em passagens com camaroeiro (50 cm de diâmetro) realizadas por dois experimentadores em sessões de duas horas, divididas por quatro épocas de amostragem: Novembro de 2011, Janeiro de 2012, Abril de 2012 e Março de 2012. Uma vez capturados, os indivíduos foram sexados, feito um esfregaço com zaragatoa (zona ventral e cloacal), para deteção de *Bd* e registado o seu SVL (*snout-vent length*, comprimento da extremidade da cabeça à cloaca) em milímetros com craveira digital, *in loco*. Os indivíduos encontrados mortos foram coletados e retiradas as falanges e/ ou húmeros sempre que possível. Aos indivíduos capturados vivos foi cortado o 3º dedo da pata posterior direita e um pedaço de tecido da cauda para futura análise de infeção por *Ranavirus*. Posteriormente, todos os indivíduos vivos foram desinfetados no local de corte com *Bactine* (Bayer, USA) e devolvidos no local de captura. Na totalidade foram recolhidas amostras de 86 animais, 66 de Folgosinho e 20 de Sazes. Os ossos e tecidos recolhidos foram preservados em etanol a 70% para posterior processamento. Durante e no final do trabalho de

campo, todo o material foi devidamente desinfetado seguindo o protocolo de higiene sugerido por Speare et al. (2004) de forma a prevenir a propagação de doenças.



Fig. 1 Locais de amostragem. **a, b**- Folgoso 12m², 2,5m de profundidade, PNSE; **c,d**- Sazes 7m², 1,5m de profundidade, PNSE

Esqueletocronologia

O método esqueletocronológico seguiu o protocolo utilizado anteriormente para urodelos (Rebello and Caetano, 1995) tendo sido feitas adaptações a nível do tempo de descalcificação (90 min) e tendo a montagem dos cortes sido realizada em clara de ovo. Foi utilizado um criostato *Clinicut 60* e *Sakura Tissue-Tek® O.C.T. Compound*, como meio de inclusão. Como corante, foi utilizada Hematoxilina de Ehrlich. Finalmente, três experimentadores observaram, independentemente, os cortes transversais e contaram as LPCs no osso perióstico, utilizando um microscópio ótico para determinação da idade individual. Após a datação independente, os resultados foram comparados e discutidos tendo em conta dados ecológicos e morfométricos.

Análises genéticas

As análises genéticas para deteção de *Ranavirus* foram realizadas a tecido de indivíduos mortos e vivos, sendo que nos primeiros foi analisado fígado e pele e nos últimos apenas a

pele envolvente das falanges recolhidas no campo, ou pedaço proveniente da cauda. O protocolo seguido foi o descrito por Mao (1996).

Para deteção de quitridiomicose, as amostras obtidas com zaragatoa foram analisadas através de *quantitative RT-PCR*, segundo o protocolo previamente descrito por Boyle et al. (2004).

Análise da água de Folgosinho

Para despistar efeitos de imunossupressão causada por poluição, foi analisada água do tanque de Folgosinho. Para análise dos compostos de azoto, e nutrientes na água, o protocolo seguido foi o descrito Koroleef, F. (1969/70). Para análise dos metais particulados e diluídos presentes na água, o protocolo seguido foi o descrito por Duarte e Caçador (*in press*).

Análise de dados

Tendo em vista a compreensão do impacto do *Ranavirus* no local onde foi detetada mortalidade, alguns resultados preliminares são apresentados para outra população, Sazes, para termos comparativos. Foi construída uma pirâmide etária para cada população e para ambos os sexos, permitindo inferir características da história de vida dos indivíduos. Para determinação da classe modal e idade de maturação, as pirâmides etárias foram analisadas tendo em conta características ecológicas e da história de vida da espécie em análise.

Para Folgosinho foi ainda construída uma pirâmide de análise dos indivíduos mortos. Foi elaborado um gráfico de dispersão, para cada população, tendo como objetivo mostrar a relação entre o SVL e idade individuais.

Resultados

Dos 78 ossos processados para análise, 84,62% permitiram a obtenção de uma estimativa da idade individual. Vários ossos recolhidos a indivíduos mortos, foram descartados por não estarem em condições de análise devido a processos de decomposição (Fig.2).

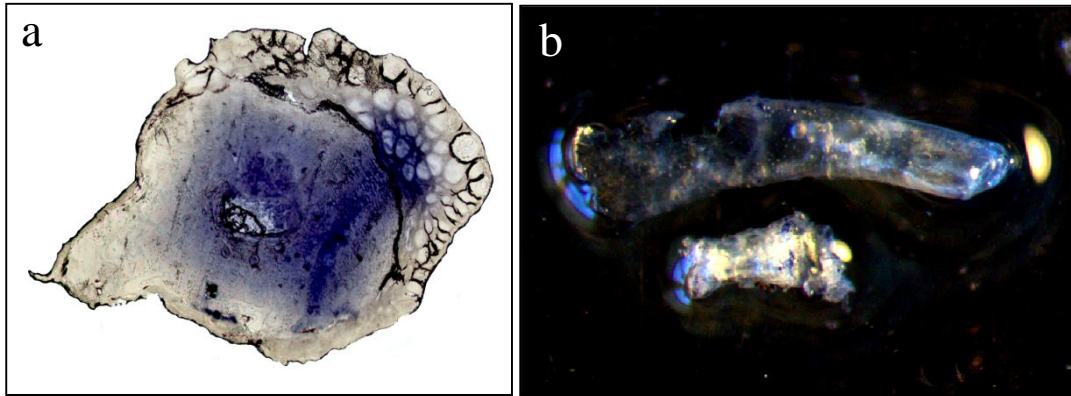


Fig. 2 Tecido ósseo danificado de indivíduos mortos. **a-** corte transversal de osso com coloração deficiente que não permite datação. **b-** em cima: húmero de indivíduo capturado morto com matriz óssea irregular e danificada, em baixo: falange de indivíduo capturado vivo, com matriz óssea uniforme.

Histologia

Quando analisados diferentes ossos do mesmo indivíduo, fêmur, húmero e falange, os resultados demonstraram ser consistentes, sendo que em dois casos a falange exibia menos uma LPC, o que é expectável devido à maior taxa de reabsorção óssea relativa destes ossos (Caetano, 1988).

Os húmeros mostraram ser os melhores ossos para realização de esqueletocronologia devido à simetria da sua secção transversal e pela clara disposição concêntrica das LPCs. No entanto, por razões éticas, estes apenas foram retirados a indivíduos mortos, evitando assim o sacrifício dos animais ou o aumento da suscetibilidade da população a infeções ou predação. Em praticamente todos os cortes observados era visível osso endosteal (Fig.3, E). Este é produzido de forma centrípeta, em direção ao interior da cavidade medular (Fig.3, CM), enquanto que o osso periosteal (Fig.3, P) é produzido centrifugamente resultando no aumento do diâmetro da diáfise com o passar do tempo (Rebelo e Caetano, 1995) (Fig.3).

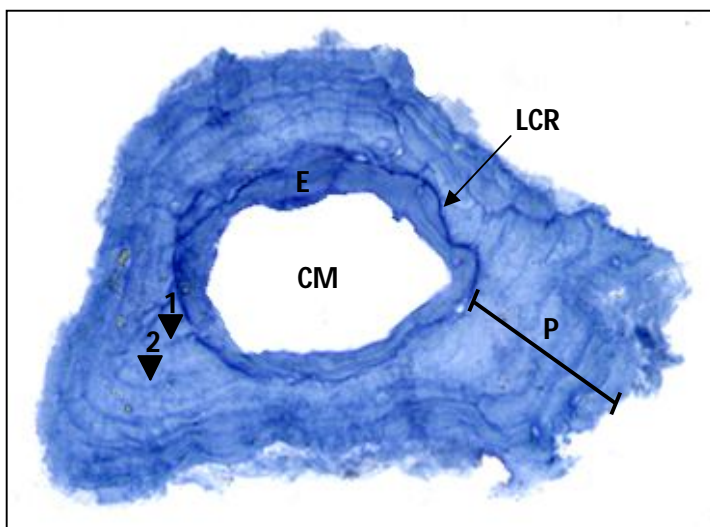


Fig. 3 Corte transversal de Húmero. **LCR**- Linha cimentante de Reabsorção, **E**- Osso endosteal, **P**-Osso periosteal, **CM**- Cavidade Medular, **1**- linha do primeiro ano, **2**- linha do segundo ano.

Em redor da cavidade medular e marcando a fronteira entre o osso endosteal e o periosteal, observa-se uma linha bem marcada, hematoxilínófila, e irregular comparativamente às LPCs designada por linha cimentante de reabsorção (Fig.3, LCR) (Castanet, 1975). Esta é uma linha aperiódica, onde ocorre reabsorção óssea. Assim, muitas vezes as primeiras LPCs são “cortadas” por esta linha, encontrando-se em processo de reabsorção. Sempre que visíveis, estas linhas foram consideradas para a datação do indivíduo (ver linhas 1 e 2 da Fig.3).

Na interpretação das LPCs, foram consideradas duplas, todas as linhas que sendo muito próximas uma da outra, exibiam fusão nalgum ponto (Fig.4, f). Estas foram consideradas como sendo apenas uma LPC, resultado de dois períodos de diminuição de atividade metabólica durante um ano (Caetano, 1988; Rebelo e Caetano, 1995). Na totalidade dos indivíduos analisados, 73,2% apresentavam pelo menos uma linha dupla.

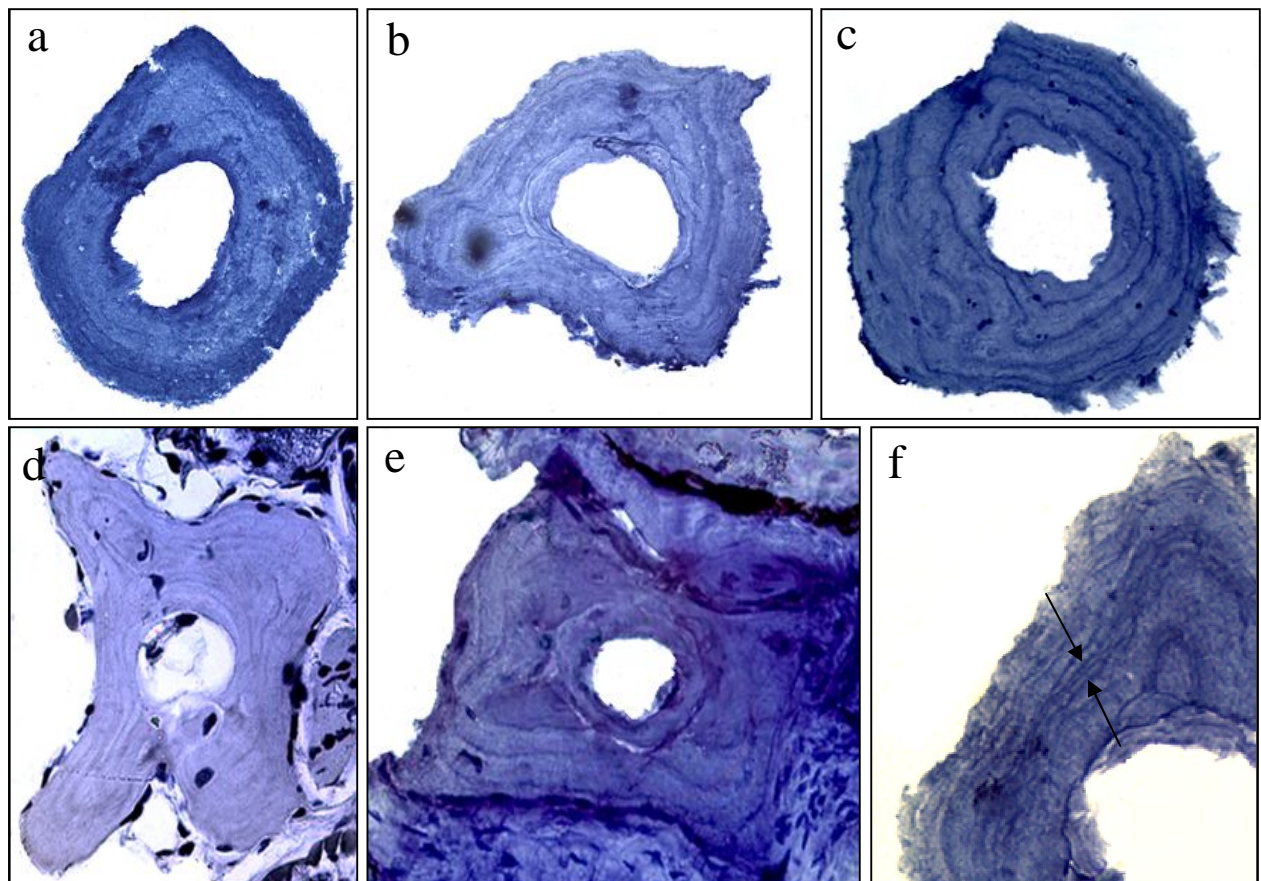


Fig. 4 Exemplos de cortes transversais de diferentes ossos e diferentes indivíduos, para datação individual. **a-** Húmero, indivíduo 067 com 6 anos de idade (amp. x10); **b-** Húmero, indivíduo 074 com 8 anos de idade (amp. X10); **c-** Húmero, indivíduo 073 com 5 anos de idade (amp. x10); **d-** Falange, indivíduo 040 com 6 anos de idade (amp. x20); **e-** Falange, indivíduo 002 com 5 anos de idade (amp. x20); **f-**Húmero, indivíduo 074, com linha dupla evidenciada pelas setas.

Dados demográficos e estrutura etária

A estrutura etária de Folgosinho (a) e Sazes (b), construída com base apenas em indivíduos vivos, está representada na Fig.5. À semelhança de outros estudos esqueletocronológicos, existe escassez de indivíduos juvenis (Rebello e Caetano, 1995) o que está associado a dificuldades de amostragem dessa fase da vida dos urodelos.

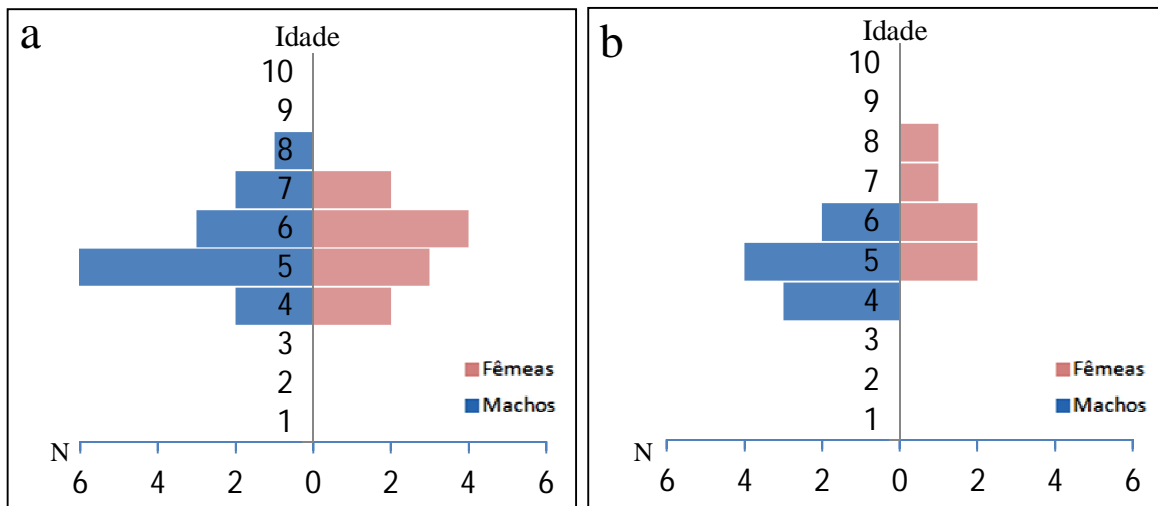


Fig. 5 Pirâmides etárias das duas populações de *Lissotriton boscai* vivos. **a-** Folgosinho **b-**Sazes; N- número de indivíduos pertencentes a cada classe etária

Em ambas as populações encontramos uma estrutura etária semelhante, com a possível exceção de serem encontrados machos mais velhos em Folgosinho. A ausência de machos com 7 e 8 anos em Sazes poderá dever-se a uma amostragem insuficiente dessa população. Pode observar-se que a classe modal para os machos de ambas as populações corresponde à classe etária 5, sendo que nas fêmeas esta classe corresponde à classe etária 6. Estes picos significam que a idade modal, idade em que todos os indivíduos da população são reprodutores ativos, difere de machos para fêmeas em 1 ano. Tal, deve-se ao facto de que, geralmente em urodelos, as fêmeas atingem a maturidade sexual mais tarde (Caetano, 1988). A idade de maturação sexual mínima dos indivíduos desta população é aos 4 anos, visto esta ser a idade mínima para indivíduos encontrados vivos na água, para onde, após a fase juvenil terrestre, os animais se deslocam com o fim de se reproduzir. No entanto nem todos os animais maturam aos 4 anos, visto que as classes modais correspondem a idades superiores.

Quando se observa a pirâmide etária construída para os indivíduos encontrados mortos em Folgosinho (Fig.6), denota-se uma grande representatividade de fêmeas, de todas as idades.

Na época de amostragem correspondente ao surto de mortalidade (Novembro) foi também amostrado o tanque de Sazes. Em 18 animais capturados, apenas 1 era macho.

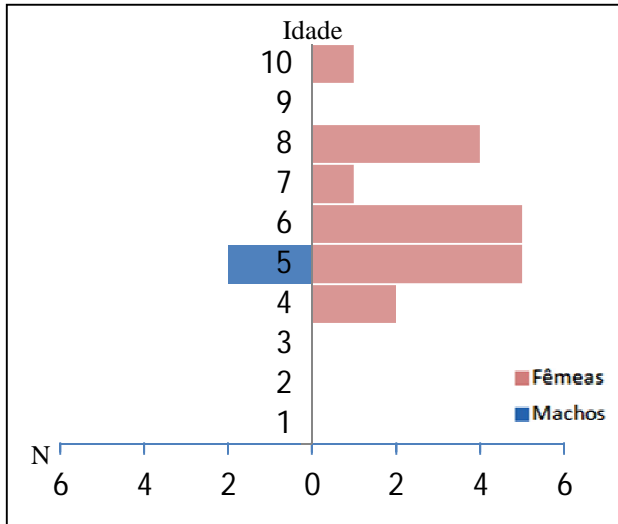


Fig. 6 Pirâmide etária para os indivíduos mortos capturados em Folgosinho; N- número de indivíduos pertencentes a cada classe etária.



Fig. 7 Dimorfismo sexual em *L. boscai*. a- Fêmea com cloaca pouco evidente e secção corporal cilíndrica, b- Macho com cloaca evidente e secção corporal quadrangular.

Tendo em conta que a determinação do sexo dos indivíduos, mesmo fora da época de reprodução, é simples (Fig.7), nenhum enviesamento foi cometido pelo experimentador na classificação dos animais. Também em Sazes, onde não foi registada mortalidade, se encontra um maior número de fêmeas na água. Assim, a pirâmide não denota, necessariamente, uma mortalidade diferencial, mas pode apenas refletir a flutuação sazonal de *sex-ratio* típica da espécie (Caetano e Leclair, 1999).

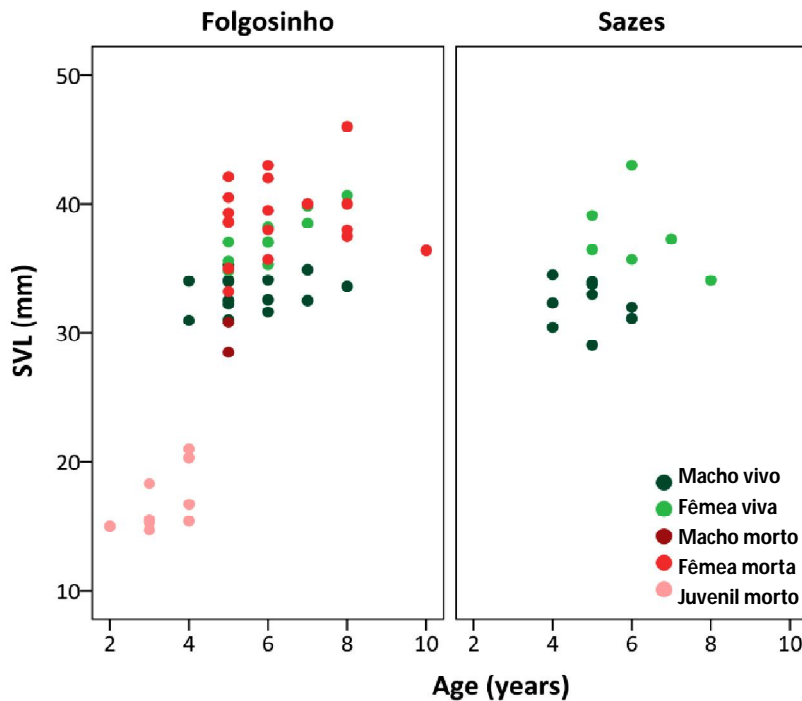


Fig. 8 Gráfico de dispersão para comparação entre o SVL e a idade dos indivíduos nas duas localidades.

O gráfico de dispersão (Fig.8) evidencia que as fêmeas são, como é típico da espécie, maiores que os machos (Caetano, 1988). Conseqüentemente, em Folgosinho é visível uma maior mortalidade em indivíduos com valores de SVL superiores, ou seja, fêmeas. Também os juvenis sofrem mortalidade o que demonstra não haver mortalidade diferencial em relação ao SVL ou a idade. Este resultado contrasta com os de outras espécies de urodelos (*Ambystoma sp.*) onde as fases larvares são indicadas como as que sofrem o maior impacto aquando a ocorrência de surtos de infecção iridoviral (Brunner et al., 2004).

Em suma, não existem diferenças óbvias entre a estrutura etária ou entre relação SVL-idade dos indivíduos de ambas as populações, embora se tenha registado mortalidade em Folgosinho e a mesma não se tenha verificado em Sazes.

Infeção

Em Folgosinho 43,75% dos indivíduos acusaram infecção por *Ranavirus*. Dos infetados 96,42% foram encontrados já mortos, sendo que apenas 1 indivíduo vivo foi diagnosticado com o vírus. Para o mesmo local de amostragem, a infecção por quitridiomicose em urodelos é nula, embora o fungo se encontre presente em sapos-parteiros (*Alytes obstetricans*) sendo causa de mortalidade nessa espécie (Rosa et al., *in press*). Para Sazes, apenas existem resultados preliminares de presença de quitridiomicose em *Alytes obstetricans*, Salamandra-de-fogo (*Salamandra salamandra*) e em *Lissotriton boscai* (50%) (Rosa, Dados não publicados) sem no entanto se verificar mortalidade em massa como a encontrada em Folgosinho.

Análise da água

Tabela 1. Análise de metais pesados a água de Folgosinho.
dl - Abaixo do limite de deteção do espectrómetro de ionização de chama

| Dissolvido | | Particulado | |
|------------|----|-------------|----|
| Cd | dl | Cd | dl |
| Zn | dl | Zn | dl |
| Pb | dl | Pb | dl |
| Cu | dl | Cu | dl |
| Co | dl | Co | dl |
| Ni | dl | Ni | dl |
| Cr | dl | Cr | dl |

Tabela 2. Análise de compostos de azoto, fósforo e dureza da água .

V.N. - Valor Normal; GH (°dH) - Dureza da água

| | V.N. | Folgosinho |
|-----------------|----------|------------|
| pH | 6,4 | 6,8 |
| NO ₃ | 0-5 ppm | 0-5 ppm |
| NO ₂ | < 1ppm | < 1ppm |
| NH ₃ | <0,5ppm | <0,5ppm |
| P | <0,05ppm | <0,05ppm |
| GH (°dH) | 8 | 13 |

Os resultados da análise aos parâmetros da água do tanque de Folgosinho confirmam a sanidade da água, sendo que nenhum dos parâmetros atinge limiares de deteção excluindo a hipótese de poluição e subsequente imunossupressão dos animais.

Execução financeira

| Designação: | Custo (€) |
|---|--------------|
| Deslocamento | |
| Gasóleo e Portagens | 110 |
| Material de recolha de amostras | |
| Luvas descartáveis | 30 |
| Ependorfs | 70 |
| Zaragatoas | 100 |
| Desinfetante (Virkon) | 15 |
| Anti-séptico (Bactine) | 20 |
| Análises laboratoriais | |
| Análises laboratoriais <i>Bd</i> (primers, sondas, reagentes, material descartável) | 1300 |
| Análises laboratoriais <i>Ranavirus</i> (reagente, primers, material descartável) | 1200 |
| Análise esqueletocronológica (reagente, meio de inclusão, lâminas) | 150 |
| Total: | 2995* |

*As análises para detecção de *Ranavirus* foram cofinanciadas pelo projeto de doutoramento de Gonçalo M. Rosa.

Caso o financiamento fosse superior, algumas análises dúbias poderiam ter sido repetidas e mais indivíduos poderiam ser analisados geneticamente tornando os dados mais robustos.

Discussão

O principal resultado do presente estudo é o facto de a mortalidade, causada pela infeção por *Ranavirus* em Folgosinho ser, aparentemente transversal e não variar com idade ou tamanho dos indivíduos. A doença matou indiscriminadamente os animais que se encontravam dentro de água estando por isso sujeitos à infeção.

A esqueletocronologia mostrou, mais uma vez, ser uma técnica eficaz de determinação da idade individual em anfíbios e os resultados obtidos são concordantes com ecologia da espécie. A maioria (73,2%) dos animais analisados apresenta linhas duplas, o que significa que as populações de Tritão-de-ventre-laranja na Serra da Estrela, a cerca de 1000 metros de altitude, passam, geralmente, por dois períodos de diminuição de atividade metabólica, num ano. O excesso de linhas duplas é um fenómeno comum em populações de altitude. Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por Caetano (1988) para populações do Gerês, a 980 metros (Mezio). No entanto, os animais da Serra da Estrela atingem a maturidade um ano mais tarde que os de Mezio, o que poderá dever-se a fatores climáticos regionais que influenciam o desenvolvimento larvar.

Níveis elevados de metais pesados na água são muitas vezes correlacionados com surtos de infeção por *Ranavirus* (Gahl e Calhoun, 2010). No entanto, a água do tanque de Folgosinho não mostrou indício de poluição para nenhum dos parâmetros testados. A quitridiomiose,

que se pensou, inicialmente, ser a responsável pelas mortes, não poderá ser considerada um fator de stresse visto estar ausente nos indivíduos, vivos e mortos, da população onde se registou mortalidade. Esta doença existe também no tanque de Sazes onde não se encontra mortalidade. Assim, o facto de o *Ranavirus* causar mortandade apenas em Folgosinho permanece por explicar. Amostragens que cubram de forma mais uniforme o ciclo-de-vida dos tritões, e análises de diversidade genética em ambos os locais poderão oferecer novas perspectivas para uma comparação mais robusta entre ambas as populações.

Amostragens em Folgosinho e Sazes são conduzidas desde 2010, sem nunca terem sido registados eventos de mortalidade em massa. Este foi, possivelmente, o primeiro evento deste género ocorrido nos últimos anos. Este facto é apoiado pela estrutura etária dos indivíduos vivos de Folgosinho (Fig.5a) que permanece muito semelhante à de Sazes (Fig.5b), onde não houve registo de mortalidade. A quase totalidade dos indivíduos mortos foi capturada em Novembro de 2011, enquanto que os indivíduos vivos são maioritariamente de Março de 2012, após o surto. Assim, seria de esperar um desequilíbrio, nomeadamente a nível de *sex-ratio*, nos animais de Março causado pela grande mortalidade de fêmeas, ocorrida na época de amostragem anterior, o que não se verifica. Tal facto pode ser justificado por, em populações de urodelos, poder existir uma dinâmica de desfasamento de períodos de atividade (e.g. Caetano, 1988). Os indivíduos capturados em Março fazem parte de um grupo, dentro da população, que está ativo nessa altura do ano, sendo estes diferentes dos animais ativos durante a época fria de Novembro. Assim, uma monitorização em Novembro do presente ano forneceria dados do grupo de indivíduos impactado pela mortalidade.

Coloca-se então a hipótese de o vírus ainda não ter tido tempo de atuação suficiente sobre a população, para que o seu efeito se reflita na estrutura etária, nomeadamente a nível da longevidade. No entanto, o surto em Folgosinho ocorreu durante o Outono/Inverno, altura em que se encontravam na água indivíduos adultos, maioritariamente fêmeas. A flutuação do *sex-ratio* é típica da espécie, já que este tende a ser equilibrado durante o pico da época de reprodução (Primavera) após a qual, com a saída dos machos da água, se torna gradualmente mais enviesado em favor das fêmeas (Caetano e Leclair, 1999). Situação que se verifica em Novembro.

A continuar a causar mortalidade na ordem das centenas, ciclicamente, sempre na mesma altura do ano, este vírus pode ter impacto na demografia da população. Devido à recorrente morte de fêmeas de várias idades, particularmente de fêmeas em idade reprodutora, vai muito provavelmente ocorrer uma diminuição drástica do efetivo populacional.

O único indivíduo vivo no qual foi detetada infecção por *Ranavirus* pode não ser significativo, ou pode ser um indivíduo moribundo. A existirem mais indivíduos vivos infetados, e sendo esta infecção de cariz sub-letal, estes podem funcionar como reservatório para o vírus, mantendo-o ativo na população. É então sugerida uma nova análise, de um maior número de indivíduos vivos.

Na maioria dos parasitas, o sucesso de infecção e a virulência são dependentes da densidade dos hospedeiros, sendo que densidades populacionais elevadas facilitam a transmissão de patogénios (Collins et al., 2004). Em Maio de 2011, foram capturados, no tanque de Folgoso, um máximo de 112 animais num dia de amostragem, com média de 107 capturas diárias. Para Sazes o valor máximo foram 73 animais e média de 57 animais capturados para os mesmos 3 dias de amostragem. (Rosa, Dados não publicados). Tendo em conta a amostragem do presente estudo (66 animais capturados em Folgoso e 20 em Sazes) observa-se que a tendência se mantém, denotando uma maior densidade populacional de *L. boscai* em Folgoso.

A grande maioria dos modelos de epidemiologia mostra que existe um limiar de densidade dos hospedeiros abaixo do qual o patogénio não consegue ter sucesso de infecção (Lafferty & Gerber, 2002). Assim, uma doença, por si só, é um improvável agente de extinção. No entanto, outros fatores estão implicados na dinâmica populacional como fatores exógenos de stresse ou, simplesmente, forças evolutivas. O agente patogénico poderá reduzir a densidade populacional abaixo do seu limiar de infecção mas, nessa fase, outros fatores de stresse imunofisiológicos, ou forças evolutivas estocásticas, amplificadas pelo efeito de *bottleneck* causado pelo parasita, podem levar a população à extinção.

Este estudo permitiu uma abordagem interdisciplinar de um surto de infecção por *Ranavirus*, cujo impacto na população não é, para já, visível. Permitiu ainda conhecer dados demográficos e da história de vida dos tritões da Serra da Estrela. No entanto, é necessário um estudo continuado das populações da zona para compreender a dinâmica da doença e as causas da mortalidade em massa. Expandir a pesquisa a outras espécies e estudos genéticos, tanto do hospedeiro como do vírus, poderiam ajudar na antevisão dos efeitos a longo prazo da presença deste parasita no meio e permitir a elaboração de um projeto de conservação.

Se os patogénios letais dos anfíbios se continuarem a propagar por todo o mundo, as perdas de espécies deste grupo fascinante de animais, facilitadas por doenças, serão o mais robusto exemplo, até à data, de como um agente patogénico pode atuar global e rapidamente causando extinções generalizadas (Collins et al., 2004).

Agradecimentos

Gostaria, em primeiro lugar, de agradecer à Fundação Amadeus Dias pelo investimento no conhecimento interdisciplinar. Agradeço também ao professor Rui Rebelo por ter coordenado todo o trabalho e ao Gonçalo M. Rosa pela co-orientação do projeto. À Maria Alho, Ana Marques, Madalena Madeira e Zé Conde pelo apoio no trabalho de campo, ao ICNB pelas autorizações que permitiram a realização do trabalho, ao Leonel Gordo pela utilização do microscópio e finalmente a Marina Ferreira pelas inúmeras leituras do trabalho final.

A bolseira

Data: ___ / ___ / ___

O Tutor

Data: ___ / ___ / ___

Bibliografia

- Alves de Matos, A.P., Caeiro, M.F., Marschang, R.E., Papp, T., Soares, C., Marçal, M.R., Carretero, M.A. (2008) Adaptation of Ranaviruses from Peneda-Gerês National Park (Portugal) to Cell Cultures and their Characterization. *Microscopy and Microanalysis* 14:139-140
- Blaustein, A.R., Gervasi, S.S., Johnson, P.T.J., Hoverman, J.T., Belden, L.K., Bradley, P.W., Xie, G.Y. (2012) Ecophysiology meets conservation: understanding the role of disease in amphibian population declines *Phil. Trans. R. Soc. B* 367: 1688-1707.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D. (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.* 60: 141–148.
- Brunner, J. L., Schock, D. M., Davidson, E. W., Collins, J. P. (2004) Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology* 85: 560–566.
- Caetano, M.H, Castanet, J. (1987) Experimental data on bone growth in *Triturus marmoratus* (Amphibia, Urodela). Proceeding of the Fourth Ordinary Meeting of the Societas Europaea Herpetologica, pp. 87-90. Nijmegen, Faculty of Science, Netherland.
- Caetano, M.H. (1988) Estudo sobre a biologia das populações portuguesas de *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800) e *Triturus boscai* (Lataste, 1879). Morfologia, ecologia, crescimento e variabilidade. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Tese de Ph.D, pp.1-359
- Caetano, M.H., Leclaire, R. (1999) Comparative Phenology and Demography of *Triturus boscai* from Portugal. *Journal of Herpetology* 33:192-202.
- Castanet, J. (1975) Quelques observations sur la présence et la structure des marques squeletiques de croissance chez les Amphibiens. *Null. Soc. Zool. Fr.* 100: 603-620
- Chinchar, V. G., Mao, J. H. (2000) Molecular diagnosis of iridovirus infections in coldblooded animals. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 27-35.
- Collins, J. P., Storfer, A. (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89–98.
- Collins, J.P., Brunner, J.L., Jancovich, J., Schock, D.M. (2004) A model host-pathogen system for studying infectious disease dynamics in amphibians: tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) and *Ambystoma tigrinum* virus. *Herpetological Journal* 14:195-200.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., Speare R. (1999) Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Perspectives* 5: 735-748.
- Daszak, P., Cunningham A.A., Hyatt A.D. (2000) Emerging Infectious Diseases of Wildlife -Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287: 443–449.
- Duarte, B., Caçador, I. (*in press*) Particulate metal distribution in Tagus estuary (Portugal) during a flood episode
- Drost, C.A., Fellers, G.M. (1996) Collapse of a regional frog fauna in the Yosemite area of the California Sierra Nevada, USA. *Conservation Biology* 10:414-25.

- Fisher, M. C., Garner, T. W. J., Walker, S. F. (2009) Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 291–310.
- Gahl, M.K.; Calhoun A.J.K. (2010) The role of multiple stressors in rana-virus caused amphibian mortalities in Arcadia National Park wetlands. *Can. J. Zool.* 88: 108-121
- Gantress, J., Maniero, G. D., Cohen, N., Robert, J. (2003) Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. *Virology* 311: 254–262.
- Gray, M. J., Miller, D. L., Hoverman, J. T. (2009) Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.* 87, 243–266.
- Gray, M. J., Miller, D. L., Schmutzer, A. C., Baldwin, C. A. (2007) Frog virus 3 prevalence in tadpole populations inhabiting cattle-access and non-access wetlands in Tennessee, USA. *Dis. Aquat. Org.* 77: 97–103.
- Harp, E.M., Petranka, J. W. (2006) *Ranavirus* in wood frogs (*Rana sylvatica*): Potential sources of transmission within and between ponds. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 307-318.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., Daszak, P. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990–994.
- Koroleef, F. (1969/70). *Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue*. *Int. Counc. Explor. Sea (ICES). Pap. C.M.* 1969/ C: 9, revised 1970, pp. 19-22.
- Lafferty, K. D., Gerber, L. (2002) Good medicine for conservation biology: The intersection of epidemiology and conservation biology. *Conservation Biology* 16: 593-604.
- Lesparre, D., Crespo, E. (2008). A Herpetofauna do Parque Natural da Serra da Estrela. Município de Ceia. p.33
- Mao, J., Tham, T.N., Gentry, G.A., Aubertin, A.M., Chinchar, V.G. (1996) Cloning, sequence analysis and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology* 216:431–436.
- McCallum M.L.(2007) Amphibian Decline or Extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology* 41: 483-491.
- Rebello, R., Caetano, M.H. (1995) Use of the skeletochronological method for ecodemographical studies on *Salamandra salamandra gallaica* from Portugal. *Scientia Herpetologica* 58:135-140.
- Rosa, G.M., Anza, I., Moreira, P. L., Conde, J., Martins, F., Fisher, M.C., Bosch J. Evidence of chytrid-mediated population declines in common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in Serra da Estrela, Portugal. (*in press*).
- Soares, C., Alves de Matos, A., Arntzen, J. W., Carretero, M., Loureiro, A.(2003) Amphibian mortality in a national park in the north of Portugal. *FROGLOG* 56:1.
- Speare, R., Berger, L., Skerratt, L. F., Alford, R. A., Mendez, D., Cashins, S., Kenyon, N., Hauselberger, K., Rowley, J. J. L. (2004) Hygiene protocol for handling amphibians in field studies. Amphibian Disease Group, James Cook University, Townsville 4811, Australia.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischmann, D. L., Waller, R. W. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786.

Anexos

Considerações Adicionais

Os resultados deste estudo serão preliminarmente apresentados, sob a forma de comunicação em poster (Fig.1), no *World Congress of Herpetology 7, Vancouver 2012*. Os resultados deste estudo serão ainda refinados e complementados, sendo posteriormente submetidos para publicação científica em Maio de 2013.

Influence of ranavirus on the age structure of Bosca's newts

G. M. Rosa^{1,2,*}, T. Laurentino³, J. Bosch³, Richard A. Griffiths¹, A. Duarte⁴, L. Tavares⁴ and R. Rebelo²

¹ Durrell Institute of Conservation and Ecology, School of Anthropology and Conservation, University of Kent, Canterbury, Kent, CT2 7NR, UK
² Centro de Biologia Ambiental, Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Bloco C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal
³ Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain
⁴ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal
 *gomp@n.rosa@gmail.com

DICE
Durrell Institute of Conservation and Ecology



Introduction

Ranavirus is one of five genera of viruses within the family Iridoviridae, and has been implicated as a contributing factor in extinctions and global decline of amphibian populations¹. Amphibians of different life stages may vary in their susceptibility to *Ranavirus* infections and this knowledge is particularly poor among the urodeles².

In November 2011, an outbreak of *Ranavirus* was recorded affecting Bosca's newts (*Lissotriton boscai*) in Serra da Estrela (Portugal) with dozens of individuals found dead in water. Transmission is thought to occur by direct and indirect means such as ingestion and contact with dead animals, or through contaminated water, sediment and soil².

The main goal of this preliminary study was to determine how *Ranavirus* influences the demography of this Bosca's newt (*Lissotriton boscai*) population, and in particular, its impact on age structure.



Methods



Fig. 1. Study sites in Serra da Estrela: A. artificial tank in Folgoso; B. artificial tank in Sazes.

Study area

Serra da Estrela includes the highest point (1993 m) in continental Portugal. The study took place at two sites at about 1000 m: Folgoso (where mortality occurred due to a *Ranavirus* outbreak) and Sazes (where no such mortality has been detected) (fig. 1).

Detection of *Ranavirus*

Surveys took place from November 2011 to May 2012, covering the whole breeding season of *L. boscai*. We assessed the infection by *Ranavirus* across the different age classes and estimated individual age in the two populations.

A total of 69 individuals were sampled: 54 from Folgoso (28 already dead and 26 alive) and 15 from Sazes (all alive). For molecular detection we used skin and/ or liver in dead animals, and a small piece of tail from living animals. Tissue samples were screened for *Ranavirus* using the PCR protocol³.

Body size and age determination

Specimens were measured from the tip of snout to the anterior margin of the cloaca (snout-vent length: SVL).

One humerus from each dead animal was removed and living individuals were toe-clipped (toe 4): bones were decalcified in 2% nitric acid for three hours, cross-sectioned (16 µm) at the midshaft of the diaphysis, and stained for 20 min with Ehrlich's hematoxylin. Age was determined by skeletochronology (adapted from⁴).

Results

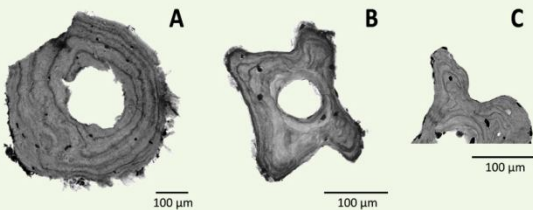


Fig. 2. *Lissotriton boscai* transverse sections: A. humerus of an individual with 5 Lines of Arrest of Growth (LAG) corresponding to 5 years; B. Phalanx. e. endosteal bone of an individual with 6 years; C. detailed phalanx evidencing double LAG.

- All dead individuals were positive for *Ranavirus*. PCR product was 99% identical to common midwife toad *Ranavirus* (CMTV)⁵.

- Age structure was similar in both populations; modal age class for males was 5 years, whereas modal age in females was 6 years (fig. 3).

- Higher mortality in females of Folgoso can be explained by the phenology of the population. At the time of sampling corresponding to the outbreak (November 2011), in Sazes we captured 18 animals: only one was a male.

- In contrast to salamanders where the disease mainly impacts the larval stages, all ages and sizes of Bosca's newt seem to be affected (see e.g. 6).

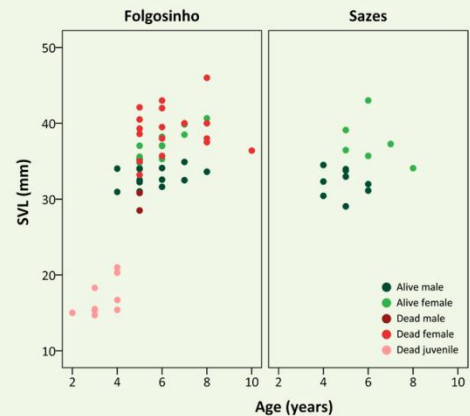


Fig. 4. Relationship between snout vent length (SVL) and age in *L. boscai* from two populations at Serra da Estrela, Portugal.

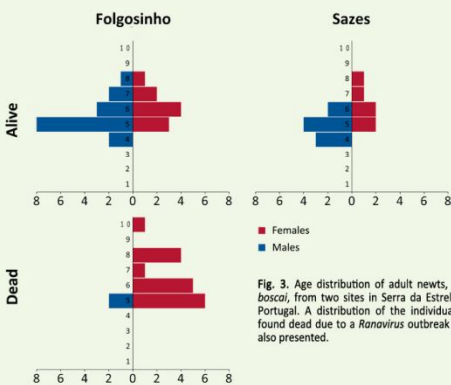


Fig. 3. Age distribution of adult newts, *L. boscai*, from two sites in Serra da Estrela, Portugal. A distribution of the individuals found dead due to a *Ranavirus* outbreak is also presented.

References

- Williams T et al. (2005) A decade of advances in iridovirus research. *Advances in Virus Research* 65: 173-248.
- Gray M et al. (2009) Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Disease of Aquatic Organisms* 87: 243-266.
- Mao J et al. (1996) Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology* 216: 431-436.
- Caetano MH, Lecler Jr R (1999) Comparative phenology and demography of *Triturus boscai* from Portugal. *Journal of Herpetology* 33: 192-202.
- Mavian C et al. (2012) The genome sequence of the emerging common midwife toad *Virus* identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses. *Journal of Virology* 86: 3617-3625.
- Brunner JL et al. (2004) Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology* 85: 560-566.

Acknowledgments

Madalena Madeira, Diogo Veríssimo, Andreia Penado, Maria Alho, Ana "Miau" and Miguel Pais for their help and invaluable support in the field. An Martel and Frank Pasmans for the crucial help with the molecular analyses. *Ranavirus* photo on the top by A. J. Carr. G. M. Rosa holds a Doctoral Scholarship from the Fundação para a Ciência e Tecnologia SFRH/BD/69194/2010.

Highlights

There was no apparent differential mortality.

Despite a massive mortality, this single event seems not to have caused a major demographic shift in the population.

Final considerations

With continuous monitoring, our results will allow to detect changes in population structure since the recent arrival of the virus to the Natural Park.

However, there is a reason for a greater concern...

... this kind of events might produce a more drastic impact on the population demography if repeatedly taking place in the same time of year, affecting consistently and mostly females.

Fig.1 Poster a apresentar no Congresso mundial de Herpetologia

Influência de *Ranavirus* na estrutura etária de *Lissotriton boscai*

2
0