



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Luisa de Pontes Ribeiro

“Chytrid fungus in bullfrog farms of the state of São Paulo and its
implications for native anurans conservation”

“O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas
implicações para conservação da anurofauna nativa”

CAMPINAS

2018

Luisa de Pontes Ribeiro

“Chytrid fungus in bullfrog farms of the state of São Paulo and its
implications for native anurans conservation”

“O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas
implicações para conservação da anurofauna nativa”

*Dissertation presented to the Institute
of Biology of the University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the Masters degree
in Ecology*

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Mestra em Ecologia*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA LUISA DE PONTES
RIBEIRO E ORIENTADA PELO LUÍS FELIPE DE
TOLEDO RAMOS PEREIRA.

Orientador: Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira

**CAMPINAS
2018**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/03344-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R354c Ribeiro, Luisa Pontes, 1990-
Chytrid fungus in bullfrog farms of the state of São Paulo and its implications for native anurans conservation / Luisa de Pontes Ribeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Rã touro. 2. Quitridiomycose. 3. *Batrachochytrium dendrobatidis*. I. Toledo, Luís Felipe, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da anurofauna nativa

Palavras-chave em inglês:

Bullfrog

Chytridiomycosis

Batrachochytrium dendrobatidis

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestra em Ecologia

Banca examinadora:

Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira [Orientador]

Cinthia Aguirre Brasileiro

Ricardo Luiz Moro de Sousa

Data de defesa: 27-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Ecologia

Campinas, 27 de julho de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira

Profa. Dra. Cinthia Aguirre Brasileiro

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Este trabalho é dedicado à minha família, principais responsáveis pela minha formação e por essa conquista. Agradeço por todo amor, incentivo, apoio e ensinamentos a mim dedicados.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Unicamp, em especial ao Prof. Dr. Martin Pareja por estar sempre prestativo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho através da concessão de bolsas de estudos (Processo nº 2016/03344-0).

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Felipe Toledo, pela oportunidade da realização desse trabalho, por todo apoio, ensinamentos e confiança em mim depositada.

Ao C. Guilherme Becker, Prof. Domingos da Silva Leite, Dr. Thomas Jenkinson e Dr. Timothy James pela grande ajuda neste trabalho, atenção e dedicação.

A todo time LaHNAB, fonoteca e micro, em especial aos queridos Tamilie Carvalho, Mariana Pontes, Joice Ruggeri, Carolina Lambertini, Carlos Henrique Almeida, Taila Alves por todas as conversas, aprendizados, companheirismo e ótimo convívio.

As minhas grandes amigas Amandinha, Alice, Lari, Luiza que foram muito importantes nessa fase, sempre dispostas a ajudar de todas as formas.

A cada um da minha família por me darem todo amor, carinho, apoio e pela paciência e confiança sempre. Vocês são essenciais em todas as etapas!

A todos, que direta ou indiretamente, auxiliaram na realização desse trabalho. Muito obrigada!

Resumo

A produção e comercialização de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, possui um grande potencial econômico e é uma prática realizada durante anos em todo o mundo. A rã-touro é uma das principais espécies de anfíbios invasores do mundo, causando muitos impactos negativos as populações nativas. Além disso, desempenha papel fundamental no processo de disseminação do fungo quitrídio (*Bd*). Levando em conta a tolerância dessa espécie à infecção por *Bd* e a criação em massa de animais, objetivamos analisar a presença de *Bd* nas rãs-touro produzidas e compreender o papel dos ranários como possíveis reservatórios e centros de disseminação do patógeno. Assim, amostramos aproximadamente 1.500 rãs em 10 ranários do estado de São Paulo quanto à presença, prevalência e carga de infecção de *Bd*; além da água que abastece e é liberada dos ranários para o ambiente. Ainda, isolamos e genotipamos cepas encontradas nos ranários e testamos se diferentes cepas isoladas de rãs-touro são tão ou mais virulentas do que as isoladas de anfíbios nativos. Para testar a virulência de cepas, expusemos indivíduos de *Brachycephalus ephippium* a diferentes cepas de *Bd*: isolados de rã-touro e isolados de hospedeiros nativos. Observamos indivíduos infectados com *Bd* em todos os ranários amostrados, com altas prevalências e cargas de infecção. O fluxo de água liberado foi alto, quase 60.000 litros diários, com uma carga média de 423 e.g. de zoósporos / litro. Além disso, encontramos 2 linhagens distintas de *Bd*: *Bd*-GPL-2 e *Bd*-Brasil. Encontramos diferença na virulência entre as cepas isoladas de rã-touro ou hospedeiro nativo, sendo a mais virulenta e a menos virulenta isoladas de rã-touro. Todos os indivíduos de *Brachycephalus ephippium* morreram com carga de infecção similar, no entanto, algumas cepas foram capazes de atingir a carga de zoósporos necessários para matar mais rápido do que outras. Nossos resultados evidenciam que os ranários estão contribuindo para a intensificação e disseminação de *Bd* para ambientes naturais. Além disso, os ranários mantêm diferentes variedades de cepas, tanto em relação à diversidade de linhagens quanto em relação à amplitude de virulência. Assim, enfatizamos a necessidade de implementar o controle e a mitigação de *Bd* nos ranários com foco na conservação de anfíbios nativos.

Palavras-chave: Rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, quitridiomiose, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranicultura, disseminação de doenças, espécies nativas.

Abstract

The production and trade of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, is of great economic potential and a practice held for years all over the world. Besides causing negative impacts on native amphibian populations, as an invasive species, it also plays a key role in the process of disseminating the chytrid fungus (*Bd*) throughout the world. Taking into account that bullfrogs are tolerant to *Bd* and the massive production of these frogs in widespread farms, it is possible that the bullfrog farms are *Bd* reservoirs and dissemination centers, not only of different *Bd* strains, but also of hypervirulent ones. Thus, we characterized farms as to the presence, prevalence and load of *Bd* infection in bullfrogs, in the water that supplies the farms, and in the water that is released back to the environment. In addition, we isolated and genotyped strains found in farms and we tested whether different strains isolated from bullfrogs are as virulent as those isolated from native anurans. We sampled approximately 1,500 bullfrogs in 10 farms of the state of São Paulo, Brazil. To test the virulence of genotypes, we exposed individuals of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium*, to different *Bd* genotypes: isolated from bullfrog farms and isolated of native hosts. Individuals were sampled by swabbing and mortality curves were constructed to evaluate the effect of *Bd* genotypes on individuals mortality. We observed individuals infected with *Bd* in all farms sampled, with high prevalence and infection loads. The water flow released from farms was high, nearly 60,000 liters daily, with an average load of 423 g.e. *Bd* zoospores per liter. In addition, we found two *Bd* strains in these farms: *Bd*-GPL-2 and *Bd*-Brasil. In the laboratory infection experiment we observed difference among genotypes, being the most and the least virulent strains those isolated from farms. Pumpkin toadlets died with relatively the same average *Bd* infection load, however, survival depended on the genotype; i.e., some genotypes were able to reach the load of zoospores required to kill earlier than others. Therefore, our results indicate that bullfrog farms are contributing to intensifying and dissemination of *Bd* into the natural environments. Besides this, farms maintain different *Bd* genotypes, both in relation to phylogenetic lineage and virulence amplitude. Based on these results, we emphasize the urgente need to implement *Bd* controlling and mitigation strategies in bullfrog farms focusing on the conservation of native amphibians.

Keywords: Bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranaculture, dissemination of disease, native species.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
<i>Declínio de anfíbios e o fungo quitrídio</i>	<i>10</i>
<i>Ranicultura no Brasil</i>	<i>14</i>
JUSTIFICATIVA	15
Bullfrog farms increase disease pressure by releasing pathogenic fungal zoospores into the environment	17
Abstract.....	18
Introduction.....	19
Methods.....	21
Results	24
Discussion	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	58

INTRODUÇÃO GERAL

Declínio de anfíbios e o fungo quitrídio

Os anfíbios representam uma classe de vertebrados de grande importância ecológica e evolutiva, seja pelo fato de corresponderem ao grupo de transição entre a água e a terra, por sua posição central em redes tróficas, ou ainda pela sua grande diversidade, ocupando uma enorme gama de microhabitats terrestres e dulcícolas (Garcia *et al.* 2009). Atualmente os anfíbios estão passando por um momento crítico em relação à conservação. Declínios populacionais e extinção de muitas espécies vêm ocorrendo em todo o mundo (Stuart *et al.* 2004). Com isso, eles representam o grupo de vertebrados mais ameaçado da atualidade, com aproximadamente 40% das espécies ameaçadas de extinção (Monastersky 2014). No Brasil, os declínios são ainda mais preocupantes, devido ao fato do país ser líder mundial em diversidade de anfíbios, apresentando a maior riqueza de anfíbios do mundo (Segalla *et al.* 2014, Frost 2018).

Diversos fatores exercem influência sobre o declínio mundial de anfíbios, como mudanças climáticas, poluição ambiental, uso de produtos agrícolas químicos, introdução de espécies exóticas, incidência de radiação UV, entre outros (Daszak *et al.* 1999, Pounds *et al.* 2006, McMenamin *et al.* 2008, Mann *et al.* 2009). Porém, a fragmentação e perda de habitats e a quitridiomicose, são consideradas atualmente fatores de maior impacto (Berger *et al.* 1998, Becker *et al.* 2007).

A quitridiomicose é uma doença infecciosa emergente causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Longcore *et al.* 1999). O fungo, pertencente ao filo Chytridiomycota, é um patógeno cuja fase infectante é aquática, apresentando o estágio livre-natante, representado pelo zoósporo, e o estágio fixo ao substrato, representado pelo zoosporângio. O zoósporo possui forma oval e flagelada e é dependente da presença de água ou do contato entre indivíduos para sua transmissão. Ao entrar em contato com as células epidérmicas do hospedeiro, o zoósporo forma um tubo germinativo, injetando seu material nuclear dentro da célula e, através de reprodução assexuada (geralmente), se desenvolve e produz novos zoósporos após a fase de maturação do zoosporângio, que desenvolve papilas para liberação dos zoósporos recém-formados na superfície da pele dos hospedeiros infectados e/ou água iniciando assim um novo ciclo de infecção (Berger *et al.* 2005, Rosenblum *et al.* 2010, Greenspan *et al.* 2012).

Em indivíduos adultos, o desenvolvimento da quitridiomicose é caracterizado pela infecção e proliferação do fungo na epiderme, causando hiperqueratose, ou seja, um aumento no número de camadas de queratina que formam a pele (Pessier *et al.* 1999), comprometendo o equilíbrio das funções fisiológicas, como troca de gases, água e eletrólitos, levando os animais à morte (Voyles *et al.* 2007). Além do desequilíbrio nas funções fisiológicas, o *Bd* produz fatores tóxicos que afetam a proliferação de linfócitos (Fites *et al.* 2013), podendo reduzir respostas imunes do hospedeiro. Nos girinos, o *Bd* é encontrado predominantemente no aparelho bucal, afetando os dentículos e bico córneo, causando despigmentação dessas estruturas (Pessier *et al.* 1999, Knapp & Morgan 2006, Vieira *et al.* 2013).

Com o desenvolvimento da doença, os animais podem apresentar lesões na pele, que variam, dependendo da espécie hospedeira, desde uma pequena descamação (em flocos de pele) até lesões macroscópicas, como eritemas cutâneos, mas de um modo geral essas lesões não são graves e específicas. Nos anfíbios severamente afetados, as alterações no sistema nervoso se manifestam como alterações comportamentais, ataxia, perda de reflexo, postura anormal, inapetência, coma e morte (OIE 2012, Voyles *et al.* 2011). Embora haja sinais clínicos já conhecidos para a quitridiomicose em algumas espécies, sabe-se que diferentes hospedeiros apresentam diferentes respostas imunológicas e fisiológicas que variam de acordo com seu hábito de vida, tempo de exposição ao patógeno ao longo de sua história de vida e condições ambientais (Gervasi *et al.* 2013a, Savage *et al.* 2015, Mesquita *et al.* 2017).

A quitridiomicose vem sendo disseminada pelo mundo, e já foi apontada como “a pior doença infecciosa já registrada entre os vertebrados em termos de número de espécies impactadas, e sua propensão para levá-las à extinção” (*in*: Fisher & Garner 2007). Atualmente, o *Bd* encontra-se amplamente disseminado, sendo registrado em todos os continentes e detectado em pelo menos 71 dos 105 países amostrados, e em 50% das espécies de anfíbios avaliadas até o momento (Olson *et al.* 2014).

Atuando em conjunto com a quitridiomicose, outros fatores intensificam as ameaças aos anfíbios (Hof *et al.* 2011). A introdução de espécies exóticas é relevante, pois essas espécies podem competir com as nativas por recursos, ou mesmo predá-las (Daszak *et al.* 1999). Uma das principais espécies de anfíbios exótica e invasora do mundo é a rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (GISD 2018). Essa espécie compete por recursos com as espécies nativas (Kraus 2015), reduzindo sua abundância e causando mudanças na ecologia espacial, além de interferir na comunicação acústica e

impactar na reprodução (Both & Grant 2012), ou mesmo predá-las (Leivas *et al.* 2013, Kraus 2015). Além disso, hospedeiros de rã-touro são tolerantes à infecção por *Bd* e podem atuar como possíveis reservatórios e vetores do patógeno (Daszak *et al.* 2004, Schloegel *et al.* 2012, Gervasi *et al.* 2013b).

Lithobates catesbeianus é uma rã nativa da América do Norte (Barrasso *et al.* 2009), e foi introduzida em muitos países para a criação em cativeiro e uso na alimentação humana, e atualmente, é comercializada internacionalmente (Flores Nava 2005, Altherr *et al.* 2011). A rã-touro pode ser considerada como o mais plausível vetor de propagação intercontinental da quitridiomiose, através da importação e exportação de espécimes infectados (Kriger & Hero 2009). Por exemplo, uma linhagem genética de *Bd* endêmica do Brasil (*Bd* - Brazil) foi detectada em uma rã-touro em um mercado em Michigan, Estados Unidos (Schloegel *et al.* 2012). Além disso, foi verificado que linhagens genéticas de *Bd* são capazes de reproduzir-se sexualmente, gerando híbridos (Schloegel *et al.* 2012). Essas constatações evidenciam o risco do comércio de rãs-touro como fonte de disseminação da quitridiomiose pelo mundo (Fisher & Garner 2007, Schloegel *et al.* 2009, James *et al.* 2015).

Dessa forma, atualmente no Brasil já foram registradas três linhagens distintas de *Bd*: *Bd*-GPL (*Global Panzootic Lineage*), a qual encontra-se amplamente disseminada pelo mundo (Farrer *et al.* 2011); *Bd*-Brazil, cuja linhagem é endêmica do Brasil e está restrita a uma estreita faixa geográfica na Mata Atlântica do Sul (Jenkinson *et al.* 2016), e híbridos entre as linhagens entre *Bd*-GPL e *Bd*-Brazil (Schloegel *et al.* 2012, Jenkinson *et al.* 2016).

Diferentes cepas de *Bd* podem apresentar variações tanto no genótipo como no fenótipo as quais podem resultar em alterações na virulência (Fisher *et al.* 2009, Lambertini *et al.* 2016). A linhagem *Bd*-GPL é potencialmente mais efetiva na disseminação em ambientes fragmentados e foi apontada com uma linhagem hipervirulenta de *Bd* (Farrer *et al.* 2011, Jenkinson *et al.* 2016). Os surtos de quitridiomiose que ocorreram no mundo estão geralmente associados a essa linhagem (Berger *et al.* 1998, Catenazzi *et al.* 2011, Hirschfeld *et al.* 2016, Carvalho *et al.* 2017). Linhagens endêmicas, como a brasileira (Schloegel *et al.* 2012), a japonesa (Goka *et al.* 2009), e a coreana (Bataille *et al.* 2013) não tem sido associadas a declínios de populações e a baixa incidência, prevalência, carga de infecção e mortalidade do hospedeiro associada a algumas dessas linhagens (Goka *et al.* 2009, Farrer *et al.* 2011, Bataille *et al.* 2013, Becker *et al.* 2017), sugerem que estas são hipovirulentas

localmente para espécies nativas (Bataille *et al.* 2013, James *et al.* 2015, Jenkinson *et al.* 2016). Por outro lado, a linhagem híbrida pode apresentar alta virulência devido ao vigor híbrido (Whaley 1944), possuir mais conteúdo de DNA, que produz mais proteínas e enzimas que poderiam aumentar sua eficiência no processo de infecção (Schloegel *et al.* 2012, Rosenblum *et al.* 2013). Parasitas possuem curtas gerações e grandes populações, o que pode promover rápidas taxas de evolução dando-lhes vantagem sobre seus hospedeiros (Hamilton 1980). Além disso, hibridização de parasitas pode gerar linhagens bastante distintas, expressando fenótipos extremos quando comparada as linhagens parentais, as quais podem sobreviver ao processo de adaptação e infectar maior quantidade e diversidade de hospedeiros do que populações parentais (Olson & Stenlid 2001, King *et al.* 2015).

De outro modo, adaptações do hospedeiro podem exercer uma forte pressão seletiva, resultando em uma variação de virulência de do patógeno, como uma corrida evolutiva armamentista patógeno-hospedeiro (Van Valen 1977). Essas diferenças podem ser observadas não só entre distintas linhagens, mas também entre as diferentes cepas de *Bd* (Becker *et al.* 2017). Assim, devido a alta tolerância que a rã-touro apresenta ao *Bd* (Hanselmann *et al.* 2004, Gervasi *et al.* 2013b, Eskew *et al.* 2015), sugerimos que em ranários esse patógeno pode apresentar variações na virulência (ou seja, capacidade de causar dano ao hospedeiro) quando comparado a cepas que se desenvolvem em hospedeiros nativos e susceptíveis ao quitrídio.

Declínios de anfíbios que ocorreram na Mata Atlântica brasileira nos anos 70 e 80 (*e.g.*, Heyer *et al.* 1988, Weygoldt 1989) foram associados à infecção por *Bd* (Carvalho *et al.* 2017), porém pouco se sabe sobre qual linhagem genética causou esses declínios, ou ainda, se pode ter ocorrido uma coinfeção por diferentes linhagens de *Bd*. A Mata Atlântica do sudeste do Brasil é a única região brasileira conhecida que abriga linhagens distintas de *Bd* que se reproduzem gerando híbridos (Schloegel *et al.* 2012, Jenkinson *et al.* 2016) e é um importante *hotspot* de biodiversidade (Myers 2003) apresentando alta riqueza e endemismo de anfíbios (Haddad *et al.* 2013). Dessa forma, conhecer a dinâmica de infecção por *Bd* e compreender o impacto direto e indireto da criação de rãs-touro em ranários dentro desse cenário é um passo muito importante e contribui diretamente para a conservação dos anfíbios na Mata Atlântica.

Ranicultura no Brasil

A ranicultura no Brasil teve início na década de 30, quando as primeiras rãs-touro foram importadas da América do Norte para o Brasil. Em 1935 foi implantado o primeiro ranário comercial no Brasil, situado no estado do Rio de Janeiro; já a ranicultura paulista teve seu início em 1939 (Silva *et al.* 2013). O mercado brasileiro de rãs teve sua valorização no início da década de 1980, porém inúmeros produtores desistiram da atividade em virtude da inadequação de instalações para a criação de rãs e das técnicas de manejo (Braz Filho 2001, Feix *et al.* 2004).

Espécies nativas do Brasil, como a rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) e a rã-manteiga (*Leptodactylus latrans*) também podem ser utilizadas para criação voltada para a alimentação humana, porém o desempenho produtivo da rã-touro em criações comerciais tem se mostrado maior quando comparado ao de espécies nativas brasileiras (Figueiredo 2005). A espécie norte americana é caracterizada pela alta rusticidade (facilidade de manejo), rápido crescimento, prolificidade (alto número de ovos por postura), resistência a enfermidades (Vieira 1993, SEBRAE 1999) e pelas qualidades nutricionais e sabor delicado de sua carne.

Em 2009 o Brasil foi apontado como o segundo maior produtor de rã, ficando atrás apenas de Taiwan (Embrapa 2015). E atualmente continua representando um importante produtor e exportador de rãs, principalmente para os Estados Unidos (Schloegel *et al.* 2009, Altherr *et al.* 2011, FAO 2018). A ranicultura brasileira apresenta infraestrutura, condições ambientais e mercado potencial promissores em algumas localidades do país. Ao todo, acredita-se que o Brasil possui aproximadamente 600 ranários implantados, além de 15 indústrias de abate e processamento (Lima *et al.* 1999), sendo contabilizados 144 ranários distribuídos na região Sudeste: 60 municípios com ranários no estado São Paulo, 16 no Rio de Janeiro, dez em Minas Gerais e três no Espírito Santo (Rodrigues *et al.* 2010).

Atualmente, os ranários são estruturados de forma a separar os animais de acordo com seu estágio de desenvolvimento. No geral, possuem os setores de reprodução, desenvolvimento embrionário, estocagem, girinagem e metamorfose, pré-engorda ou seleção fenotípica, de engorda, e ainda, áreas de manejos alimentar e sanitário (Ferreira *et al.* 2002). Os sistemas de engorda conhecidos são: tanque-ilha (Fontanello *et al.* 1984), confinamento (Oliveira 1983), anfigranja (Lima & Agostinho 1988), gaiolas (Fontanello *et al.* 1988), ranabox, climatizado (Fontanello *et al.* 1993) e inundado (Mazzoni *et al.* 1996). Existem ainda, ranários construídos com acréscimo de

detalhes ou combinação de sistemas, são os chamados sistemas híbridos (Ferreira *et al.* 2002).

Um fator importante e que deve ser analisado com atenção é a qualidade da água para produção das rãs e as doenças que podem ser disseminadas sem a devida profilaxia. O abastecimento de água dos tanques geralmente ocorre em fluxo contínuo (Ferreira *et al.* 2002), o qual é liberado dos ranários para o ambiente externo diariamente. O fluxo de água contínuo deve ocorrer para que haja uma renovação da água, eliminação de excretos e restos de pele das rãs, e a limpeza dos tanques (Ferreira *et al.* 2002). Esses cuidados devem ser tomados para evitar a proliferação de doenças entre as rãs-touro produzidas. Dentre elas, as principais encontradas e tratadas em ranários são principalmente causadas por bactérias, como dos gêneros *Aeromonas*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (FAO 2018). Porém, na maioria dos ranários não há nenhuma medida de profilaxia ou tratamento realizado visando a eliminação do fungo quitrídio.

Desde a implementação do primeiro ranário até o momento, diversas falhas estruturais e metodológicas nos criadouros facilitaram a “invasão” desses animais exóticos a novos ambientes. As fugas e solturas das rãs são ações corriqueiras entre os ranários (Collins *et al.* 2009, Both *et al.* 2011). No Brasil, populações ferais de *L. catesbeianus* já foram encontrados em pelo menos 130 municípios localizados em áreas de Mata Atlântica (Both *et al.* 2011). Além disso, estudos preveem que mudanças climáticas futuras podem oferecer condições favoráveis para o estabelecimento e ampliação da área de distribuição de rã-touro na América do Sul (Ficetola *et al.* 2007, Giovanelli *et al.* 2008, Loyola *et al.* 2012). Assim, existe uma grande necessidade de tomar medidas visando a conservação de anuros nativos, considerando a ameaça que a rã-touro representa como espécie invasora e o papel considerável da produção e comércio desses animais como disseminadores de *Bd* pelo mundo (Fisher & Garner 2007, Schloegel *et al.* 2009, Jenkinson *et al.* 2016).

JUSTIFICATIVA

Em síntese, a produção e o comércio de rã-touro podem ser responsáveis pela importação de cepas de outras regiões para fauna nativa do Brasil, ou mesmo exportação de linhagens genéticas endêmicas, facilitando a geração de híbridos e até

mesmo novas linhagens que podem ser altamente virulentas a populações locais. Assim, faz-se importante a caracterização dos ranários brasileiros quanto à ocorrência de *Bd* e de qual forma esses estabelecimentos podem estar disseminando o patógeno para ambientes naturais. Além disso, analisar quais cepas estão presentes nos ranários, se desenvolvendo nos hospedeiros tolerantes e, caracterizar a virulência dessas cepas quando comparadas com cepas que são encontradas em anfíbios nativos é importante para compreensão da evolução do *Bd* nesses estabelecimentos. A compreensão da epidemiologia da doença nos ranários pode auxiliar como uma ferramenta para conservação dos anfíbios através da eliminação e/ou controle de *Bd* nos ranários.

Bullfrog farms increase disease pressure by releasing pathogenic fungal zoospores into the environment

Luisa Ribeiro¹, Tamílie Carvalho¹, Thomas S. Jenkinson², Domingos da Silva Leite³, C.
Guilherme Becker⁴, Timothy Y. James², Luís Felipe Toledo¹

¹ Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

² Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 48109, USA

³ Laboratório de Antígenos Bacterianos, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

⁴ Department of Biological Sciences, University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama 35487, USA

*Corresponding author: Luisa P. Ribeiro, Universidade Estadual de Campinas, lupribeiro70@gmail.com

Abstract

Bullfrog farming and trade is a practice of significant economic value that has been historically held in several continents. Besides causing negative impacts on native amphibian populations as an invasive species, bullfrogs play a key role disseminating the frog-killing fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in the natural environment. Bullfrogs are tolerant to *Bd* – meaning that they carry high infection loads without developing chytridiomycosis. To test the potential of bullfrog farms as reservoirs for diverse and virulent chytrid genotypes we quantified presence, prevalence and *Bd* infection loads across approximately 1,500 farmed bullfrogs and in the water that is released from bullfrog farms into the environment. Additionally, we described *Bd* genotypic diversity within frog farms through isolating *Bd* from dozens of infected tadpoles. Because virulent pathogen strains are often selected when growing in tolerant hosts, we experimentally tested whether *Bd* genotypes isolated from bullfrogs are more virulent for native anuran hosts when compared to genotypes isolated from native hosts. We observed individuals infected with *Bd* in all sampled farms, with high prevalence (reaching 100%) and high average infection loads (71,029 zoospore g.e.). Average outflow water from farms was high (60,000 L/day), with *Bd* zoospore concentration reaching approximately of 50 million zoospores/L. We genotyped 36 isolates from two different lineages, and found that *Bd* genotypes isolated from bullfrogs show similar virulence on native toads when compared to genotypes isolated from native hosts. However, we found significant virulence variation among strains; some strains were able to reach zoospore loads sufficient to kill earlier than others. Our results indicate that bullfrog farms can harbor diverse *Bd* genotypic diversity (and thus virulence) and may be contributing to disseminate the pathogen in the natural environment. We highlight the urgent need to implement *Bd* monitoring and mitigation strategies in bullfrog farms to aid in the conservation of native amphibians.

Keywords: Bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, ranaculture, dissemination of disease, native species.

Introduction

Humans have long used amphibians as food source (Teixeira et al. 2001; Warkentin et al. 2009; FAO 2018). The Frog leg industry supply local, national and international markets in Latin America, USA, Asia, Africa, and the EU (Altherr et al. 2011); the main importers of frogs are the USA and EU. USA imported about 9,930 tons of frogs between 2003 and 2006, totaling an amount of over 42 million USD. In the period 2001 to 2011, the UE imported an average annual volume of 4,600 tons of frog legs, representing between 928 million and 2.3 billion frogs (Altherr et al. 2011). To supply this huge frog leg market, several countries raise frogs in farms including: Indonesia, China, Taiwan, Brazil, Mexico, Ecuador, and Guatemala (FAO 2018). Different strategies have been employed to supply the evergrowing frog leg trade. Some countries actively harvest frogs from their natural habitat and sell (or consume) them directly, causing population declines and threatening species with extinction (Oza 1990; Schlaepfer et al. 2005). Example of this include *Nasikabatrachus sahyadrensis* (Thomas & Biju 2015), *Hoplobatrachus tigerinus* and *H. crassus* (Ghosh 2018) in India, several species in the genera *Amolops*, *Nanorana*, and *Xenophrys* in the Himalaya region (Chettri et al. 2011), *Hoplobatrachus rugulosus* in South Asia (AmphibiaWeb 2018), *Rana draytonii* in California, USA (Jennings & Hayes 1985), and *Conraua goliath* in Cameroon and Equatorial Guinea, Africa (Akani et al. 1998; IUCN 2004; Carpenter et al. 2014).

In order to maintain a steady supply of frogs, ranaculture was established in many places. Although frog farms often breed local amphibian species, the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is by far the most commonly raised and traded species (Schlaepfer et al. 2005). Bullfrogs are native to eastern North America (Barrasso et al. 2009; Frost 2018), has been introduced in many countries for farming, and is traded internationally (FAO 2018; Frost 2018). Global bullfrog production sharply increased from less than 200 tons in 1990 to over 4,000 tons in 2014 (FAO 2018). Although bullfrog farms emerged as an alternative to overharvesting (Carpenter et al. 2007), a lack of biosecurity protocols in both farming production and frog commercialization raises obvious concerns about their potential negative impacts on native species, especially due to continuous escapes of bullfrogs to the surrounding areas and uncontrolled trade (Garner et al. 2006; Fisher & Garner 2007; Lau et al. 2008; Both et al. 2011).

Bullfrog farms have played a pivotal role in the current amphibian crisis by facilitating biological invasions (Kats & Ferrer 2003; Fisher & Garner 2007; Laufer et al. 2008; Schloegel et al. 2009; Carpenter et al. 2014; GISD 2018; O’Hanlon et al. 2018). Currently, North American bullfrogs are one of the most common and aggressive invasive amphibian species in the world (Kraus 2015; Frost 2018). Invasive bullfrogs often negatively impact the local anurofauna while impacting acoustic communication and jeopardizing reproduction of natives (Medeiros et al. 2017; Forti et al. 2017), prey on native amphibian species (Leivas et al. 2013) and competing for resources reducing the fitness of native populations (Kiesecker et al. 2001; Boone et al. 2004). Furthermore, bullfrogs may have an important role in the dynamics of chytridiomycosis, a disease caused by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Several studies indicate that bullfrogs often serve as pathogen reservoirs (Daszak et al. 2004; Hanselmann et al. 2004; Garner et al. 2006) and international pathogen vector (Kriger & Hero 2009; Schloegel et al. 2012; O’Hanlon et al. 2018). Schloegel et al. (2012) showed the overseas transportation of novel *Bd* strains by finding an endemic Brazilian *Bd* lineage (*Bd*-Brazil) in a bullfrog sold in a market in Michigan, United States and suggested that the lineage was also present in Asia on invasive bullfrogs. Recently, an Asian lineage (*Bd*-ASIA-1) was found in trade animals in Belgium (O’Hanlon et al. 2018).

Divergent *Bd* lineages show both genotypic and phenotypic variations, which may result in differential virulence (Fisher et al. 2009; Lambertini et al. 2016; Greenspan et al. 2018). *Bd*-GPL (Global panzootic lineage) is a globally distributed, hypervirulent and implicated in amphibian declines in several parts of the world (Farrer et al. 2011; Rosenblum et al. 2013; O’Hanlon et al. 2018). Previous studies indicate that endemic lineages tend to be less virulent than *Bd*-GPL, as reported for *Bd*-Brazil (Becker et al. 2017; Greenspan et al. 2018), *Bd*-Cape, *Bd*-CH (Farrer et al. 2011), and *Bd*-ASIA-1 (O’Hanlon et al. 2018).

From the host's perspective, immunological defenses and physiological tolerance differ across amphibian species (Gervasi et al. 2013a; Mesquita et al. 2017). This is particularly important for bullfrogs, which are chytrid tolerant hosts (Hanselmann et al. 2004; Eskew et al. 2015); they are able to withstand high pathogen loads without developing chytridiomycosis (but see exceptions in Mazzoni et al. 2003; Gervasi et al. 2013b). Therefore, this species may be a substrate for the selection and evolution of different virulence of the chytrid fungus. Bullfrog farms maintain frogs in high density,

providing greater opportunities for contact between hosts and pathogen strains. This could lead to animals with high infection loads and increase the probability of sexual reproduction between divergent pathogen strains.

In addition, the water used for production of the bullfrogs is returned to the natural environment potentially transmitting the pathogen to native amphibian populations. Therefore, the production and trade of bullfrogs may be directly related to the conservation of native anurofauna. In Brazil, ranaculture began in the 1930s, but its popularization and increase in establishment occurred in the 1970s (Ferreira et al. 2002). It was just after this increase in bullfrog production in Brazil that we observed the sharpest declines in native amphibians, probably associated with an outbreak of chytridiomycosis between the 1970s and 1980s (Carvalho et al. 2017). Recently, the Brazilian ordinance proposes that introduced aquatic species, as bullfrog, should be considered “native” to foster aquaculture development. This could potentially cause even more introductions and lead to the loss of ecosystem services and functions (Brito et al. 2018).

To evaluate the impact of chytrid dissemination due to frog farming, we sampled bullfrogs across life stages (tadpoles, juveniles and adults), as well as the water outflow used in regular frog farms. We also isolated and genotyped *Bd* strains found in frogs, and performed infection experiments testing for differences in *Bd* virulence among strains isolated from native hosts and farmed bullfrogs. We hypothesized that because of the high *Bd* tolerance in bullfrogs (Daszak et al. 2004; Eskew et al. 2015), strains isolated from bullfrogs would be more virulent against a native Brazilian host species than those isolated from native frogs. Combined, our results show that bullfrog farms can increase the spread of divergent *Bd* strains and lineages into natural environments. We also provide important information about the dynamics of the disease in the amphibian trade that should be used to guide actions directed at conserving native anurans, not only in Brazil, but throughout the world.

Methods

Bullfrog farm assessment

We sampled 10 bullfrog farms in the state of São Paulo, Brazil; our sampling assessed *Bd* presence, prevalence, and infection load in farmed bullfrogs. We collected epidermal tissue samples from 35 juvenile post metamorphs from each of eight farms and from 35

adult bullfrogs in nine farms following protocols by Lambertini et al. (2013). In order to avoid cross-contamination, we used disposable gloves to handle each individual frog. Additionally, we sampled 100 tadpoles from each of nine farms for the presence of *Bd* (Supporting Information). We selected tadpoles at the Gosner stage 25 and visually inspected jaws sheaths and tooth rows. Because mouthpart depigmentation is a reliable proxy for *Bd* infection in tadpoles (Knapp & Morgan 2006), including Brazilian species (Vieira et al. 2013; Carvalho et al. 2017), we considered *Bd* infected individuals (*Bd*⁺) those showing significant signs of depigmentation. In addition to detecting and quantifying *Bd* from individual frogs, we collected water samples and standardized a filtering protocol to detect the pathogen in the aquatic environment. We sampled water outflow in each farm from into the natural surrounding environment (Supporting Information). Using a vacuum pump, we sampled *Bd* zoospores and zoosporangia using a permeable membrane with 0.45 µm pore size (Supporting Information). After filtering, we extracted DNA from membranes and quantified *Bd* by qPCR as described above.

qPCR, *Bd* isolation and sequencing

We extracted *Bd* DNA from swab samples of juveniles and adult amphibians using PrepMan ULTRA (Life Technologies) and performed quantitative PCR analyses for *Bd* detection and quantification according to Lambertini et al. (2013). We considered *Bd*⁺ samples those with zoospore genomic equivalents (g.e.) ≥ 1 (Krieger et al. 2006). We estimated *Bd* infection prevalence (for tadpoles, juveniles and adults) as the number of infected individuals divided by the total number of sampled individuals for each farm.

We isolated *Bd* strains from tadpoles that showed signs of mouthpart depigmentation, following protocols by Vieira and Toledo (2012). After isolation, we transferred *Bd* cultures into Petri dishes containing 1% Tryptone Agar and incubated cultures for one week. Then, we extracted DNA from the culture, following protocol by James et al. (2008). We genotyped each *Bd* isolate using a sequence of 6 SNP markers (Supporting Information) as described by Schloegel et al. (2012) and sequenced them in the Sequencing Core Lab at University of Michigan.

Laboratory infection experiment

We conducted a series of experimental inoculations in the laboratory to test for the effect of different *Bd* strains on amphibian hosts. We used 56 pumpkin toadlet

individuals, *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae) in challenge experiments. We actively searched and collected specimens of *B. ephippium* (about 2 cm in snout-vent-length) in the municipality of Mogi das Cruzes, state of São Paulo, Brazil. We housed each captured individual in an individual plastic bag with leaf-litter to avoid cross-contamination among individuals while in the field. At the onset of the experiment, we individually housed each individual frog in plastic boxes (22 x 15 x 8 cm) covered with autoclaved moist *Sphagnum* moss. We monitored frogs daily and fed them calcium-fortified pinhead crickets. We carried out the experiment in a temperature-controlled room, with temperatures set at 20 °C and 12 h of day-night cycle. Our collecting permit was provided by ICMBio (SISBio #54656-3; 27745-13; 17242-3) and experimental procedures were approved by the ethics committee (CEUA #4688-1/2017).

We divided the 56 pumpkin toadlets (species endemic to the Atlantic Forest) into seven treatments with eight individuals per treatment. We exposed frogs to the following treatments: i) three *Bd* isolates from bullfrogs, ii) three *Bd* isolates from native amphibian hosts, and iii) one negative control (autoclaved water; Supporting Information). All strains were within the *Bd*-GPL-2 clade (Schloegel et al. 2012) which is the dominant form in the Brazilian Atlantic Forest (Jenkinson et al. 2016). We cultured *Bd* strains of the in Petri dishes with tryptone agar at 17 °C for five days. Then, we harvested *Bd* zoospores by flooding Petri dishes with distilled water, waiting for approximately one hour for zoospore release from zoosporangia. We then quantified the zoospores in a Neubauer hemocytometer and standardized the inoculum concentration (4.6×10^6 zoospores/ml) among isolates.

Pumpkin toadlets were individually kept in Petri dishes in direct contact with the 1 ml of *Bd* inoculum for 45 minutes. We placed individuals from the control treatment (*Bd*⁻) in contact with the same volume of distilled water from the *Bd*⁺ treatment, but without addition of the pathogen inoculum. We swabbed each pumpkin toadlet 16 and 31 days following experimental inoculation, which is enough time for multiple *Bd* generations (Longcore et al. 1999). We monitored amphibians daily and swabbed dead or dying individuals. We used the same DNA extraction and qPCR protocols described above to detect and quantify *Bd* (Lambertini et al. 2013).

Statistical Analyses

Bullfrog farm assessment

We used a Generalized Linear Model (GLM) with a binomial distribution (logit link) to test whether *Bd* prevalence varies among host developmental stages (tadpole, juvenile and adult); we performed a Tukey HSD *a posteriori* test for multiple comparisons. We also ran a GLM with normal distribution (identity link) to test for differences in *Bd* infection loads among stages of development (juvenile and adult), log transforming the response variable to meet normality assumptions.

Laboratory infection experiment

We built survival curves (Parametric Survival analyses) to statistically test the effect of isolation source (native frogs or bullfrogs) on the survival of individual hosts. We performed a similar analysis to test the effect of strains on host survival. In addition, we used a Generalized Linear Mixed Model (GLMM) to test whether *Bd* infection load in *B. ephippium* exposed to bullfrog *Bd* isolates were higher than those exposed to isolates from native frogs; we included the six *Bd* isolates as a random effect in this analysis. For these analyses, we included samples collected halfway through the experiment (day 16) and included swabs of individual frogs that died before day 16; we excluded the control group from this particular analysis. We also performed a Tukey HSD *a posteriori* for pairwise multiple comparisons among means. We also used a simple Analysis of Variance (ANOVA) to test for differences in average infection loads at the point of mortality among individuals exposed to different strains. Finally, we used Proportional Hazard analysis, including the interaction between infection load and strains, to test whether survival depended on these factors. We also excluded the control group from this analysis.

Results

Bullfrog farm assessment

Bd prevalence in tadpoles ranged from 0 (2 farms) to 48% in our focal bullfrog farms. *Bd*-positive post-metamorphs were recorded in all farms; with some farms reaching 100% prevalence with infection loads of up to 71,029 zoospore g.e. (Fig. 1a & Table 1). We detected differences in *Bd* prevalence among amphibian developmental stages ($F = 4.124$; $P = 0.029$), where juveniles presented higher *Bd* prevalence than tadpoles (Tukey $P = 0.03$), but not adults (Fig. 2a). Juveniles presented a higher infection load than adults ($t = 6.55$, $df = 1$, $P < 0.001$) (Fig. 2b).

We consistently observed a high *Bd* zoospore concentration in the outflow water. The average outflow of water averaged 60,000 L per day. These outflow water samples had high average zoospore concentrations, reaching approximately 50 million zoospore g.e. released per day (Fig. 3).

We isolated 36 strains [7 from farm #4, 7 from farm #8, 8 from farm #9, and 14 from farm #10 (Fig. 1b)] from tadpoles showing clinical signs of chytridiomycosis. We found isolates from *Bd*-GPL-2 lineage in these four farms. In two of these farms, we also found the *Bd*-Brazil lineage. Furthermore, we isolated two lineages coinfecting the same tadpole (*Bd*-GPL-2 and *Bd*-Brazil).

Laboratory infection experiment

We did not observe differences in the survival rates between toadlets infected with strains isolated from farmed bullfrogs and native frogs from natural environments ($\chi^2 = 0.082$; $df = 1$; $P = 0.774$), although we detected a difference in host survival among *Bd* strains ($\chi^2 = 37.269$; $df = 5$; $P < 0.0001$; Fig. 4a). The strains that led to the highest and lowest mortality rates in pumpkin toadlets were isolated from a bullfrog farm (Fig. 4a).

In agreement with our survival analysis, we also did not find significant differences in *Bd* infection loads between *B. epaphii* exposed to isolates obtained from farmed bullfrogs and native frogs ($F_{(1,46)} = 0.002$; $P = 0.965$), though individual strains showed significant variation in infection loads ($F_{(6,49)} = 68.918$; $P < 0.0001$) (Fig. 4b & Supporting Information). We also observed that individual *B. epaphii* that died during the experiment showed similarly high *Bd* infection loads ($>10^5$ g.e.), independent of strain ($F_{(5,35)} = 1.674$; $P = 0.168$) (Table 2). Survival probability, however, depended on strain identity, with some strains able to reach a critical load of zoospores required to kill earlier than others (Table 3).

Discussion

The high prevalence and infection load we found in farms can be explained by the high density of frogs in these farms, favoring pathogen transmission by direct contact among individuals or by circulating the water over all frog pens (Rachowicz & Vredenburg 2004; Berger et al. 2005). We showed that juveniles had higher prevalence when compared to tadpoles, and higher infection load when compared to adults. During metamorphosis, tadpoles undergo several physiological processes that reshape the

immune system, making juveniles more fragile, resulting in a greater susceptibility to *Bd* infection (Rollins-Smith 1998; Fernández-Loras et al. 2017). In addition, newly metamorphosed individuals may be more affected by *Bd* infection, since it is the stage in which keratinization of the skin occurs, providing more substrate and making them an excellent host for keratinophilic pathogens such as *Bd* (Berger et al. 1998).

The observation of *Bd* in all farms and hosts life-stages suggests that this pathogen can also interfere economically in ranaculture affecting the commercial production of bullfrogs. Although this species tolerates *Bd* infection (Daszak et al. 2004; Eskew et al. 2015), studies show that bullfrog tadpoles displayed multiple cardiac alterations in response to infection (Salla et al. 2015), possibly representing a high energy cost to the animals that are in development and potentially reducing growth, metamorphosis and post-metamorphic survival. Furthermore, other sublethal effects have been reported, such as behavioral changes and reduced performance for feeding (DeMarchi et al. 2015). Chytrid infection may also affect frog immune responses, increasing the susceptibility to other infections (Miller et al. 2008). Therefore, controlling chytrid infections in frog farms will certainly increase local establishments profits, due to better growth and quality of frogs produced.

Past studies showed that invasive bullfrog populations harbor high prevalence of chytridiomycosis and could potentially have dispersed the chytrid fungus globally through the international food trade (Garner et al. 2006; Schloegel et al. 2009; O'Hanlon et al. 2018). However, we lack information on how current frog farming may exacerbate the current chytridiomycosis problem by amplifying pathogen propagule pressure and acting as a reservoir or breeding ground for novel *Bd* strains that could be released into the environment and native wildlife. Our study demonstrates that bullfrog farms release large quantities of zoospores into the surrounding aquatic environments.

Alarmingly, we observed high levels of pathogen zoospores in the outflow water of bullfrog farms. All released daily into the natural surrounding environment without treatment for the chytrid fungus. The water with high *Bd* concentrations occurring probably a consequence of the passage across infected frog pens. This discharge of *Bd* zoospores we observe from bullfrog farms will not only contribute to the maintenance of *Bd* in the natural environment, but also to introduce this pathogen into new sites. Furthermore, the detection of two *Bd* lineages within farms, *Bd*-GPL and *Bd*-Brazil even in the same tadpole, creates a high potential for hybridization. Hybrid lineages,

such as the one between *Bd*-GPL and *Bd*-Brazil in the Brazil's Atlantic forest (Schloegel et al. 2012; Jenkinson et al. 2016), could present high virulence according to the theory of hybrid vigor (Whaley 1944; Greenspan et al. 2018). Hybridization is still apparently rare in the wild (Jenkinson et al. 2016; O'Hanlon et al. 2018), but has important consequences, as hybrids may have heightened virulence (Ghosh & Fisher 2016; Greenspan et al. 2018).

We found that farms harbor a wide variation in virulence of strains. A farm environment with high densities of positive *Bd* animals represents the perfect scenario for chytrid survival and reproduction (Vredenburg et al. 2010). In addition, we expect to see evolution of parasites on the farm, due to their short generation times and large population sizes that can promote rapid rates of evolution (Hamilton 1980). The genetic diversity of strains may reflect diversity in virulence (Fisher et al. 2009), as we observed in studied farms. The major concern for amphibians and farmers is that the greater diversity of *Bd* genotype and phenotype will make it challenging to apply effective treatments.

Regardless of the strains, individuals of *B. ephippium* died when the infection load surpassed 100,000 g.e. zoospores, which is a very heavy burden for a frog that is among the smallest known (< 2 cm). Another infection load threshold, 10,000 zoospores, was considered to be fatal for other species (Vredenburg et al. 2010; Kinney et al. 2011). However, such thresholds may be different for direct-developing species, such as *B. ephippium*. These species, when infected with *Bd* may present very high infection loads, because they do not have much contact with the pathogen throughout their life history (Mesquita et al. 2017).

Our study emphasized the great impact that bullfrog farms may have on the spread of *Bd* in the local environment. In addition, it suggests *Bd* strains that evolve on bullfrog farms are likely to impact native susceptible species through the release of zoospores into the environment, a form of pathogen spread. Our results indicate that bullfrog farms, which are distributed across the world, provide a potential environment for reproduction, maintenance and dissemination of *Bd* inside and outside farms. A possible way to reduce the dissemination of chytrid fungus by farms would be to treat the water that is released to the environment. Additionally, bullfrogs must be treated for *Bd* infection as well, adopting one of the several already reported treatment methods (reviewed in Moreno et al. 2015). However, future studies aimed at treatment and

control of *Bd* in amphibian farming systems need to be conducted, and are fundamental to assist native amphibian conservation.

Acknowledgements

We thank all bullfrog farm owners for allowing access to specimens and water used in experiments. Thanks to JRG and CL for field assistance and figure editing, and CMFM for enabling and assisting the sampling in one of the bullfrog farms. Financial support was provided by grants from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP #2016/03344-0; #2016/25358-3) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq #300896/2016-6) and US National Science Foundation (DEB-1601259).

Table 1. *Bd* prevalence [presented as percentage (*Bd*⁺/tested individuals)], infection load [values presented as mean; SD (range)], and developmental stage of the bullfrogs sampled in farms.

Bullfrog farm	Prevalence (%)	Load (zoospore g.e.)	Stage
#1	18 (18/100)	-	Tadpole
	0 (0/35)	-	Juvenile
	8.6 (3/35)	4; 3 (2 – 7)	Adult
#2	0 (0/102)	-	Tadpole
	40 (14/35)	30; 48 (2 – 176)	Juvenile
	51.4 (18/35)	14; 25 (1 – 108)	Adult
#3	0 (0/100)	-	Tadpole
	97.2 (35/36)	255; 865 (2 – 5,038)	Adult
#4	22 (22/100)	-	Tadpole
	20 (7/35)	11; 14 (2 – 41)	Juvenile
	8.6 (3/35)	3; 3 (2 – 6)	Adult
#5	3 (3/100)	-	Tadpole
	100 (35/35)	3,095; 11,874 (35 – 71,030)	Juvenile
	28.6 (10/35)	4; 2 (2 – 9)	Adult
#6	1 (1/100)	-	Tadpole
	74.3 (26/35)	73; 162 (1 – 835)	Juvenile
	0 (0/34)	-	Adult
#7	98 (34/35)	94; 193 (1 – 1,195)	Juvenile
#8	48 (48/100)	-	Tadpole

	97.1 (34/35)	2,193; 7,208 (4 – 31,650)	Juvenile
	62.9 (22/35)	32; 53 (2 - 250)	Adult
#9	6 (6/100)	-	Tadpole
	91.4 (32/35)	93; 292 (3 – 1,597)	Adult
#10	44 (44/100)	-	Tadpole
	51.4 (18/35)	20; 34 (1 – 141)	Juvenile
	82.9 (29/35)	68; 144 (2 – 667)	Adult

Table 2. Infection load of strains on days 16 and day of death; values presented as mean; SD (range; sample size).

Strains	Day 16	Day of death
C	1; 1 (0 - 4; 8)	All survived
N1	31,261; 38,035 (330 - 102,645; 8)	828,748; 713,838 (166,029 - 1,786,135; 7)
N2	152,271; 130,841 (26,118 - 343,459; 5)	564,221; 214,328 (227,469 - 945,888; 8)
N3	47,925; 44,678 (2,147 - 120,497; 8)	693,070; 498,886 (104,653 - 1,465,878; 6)
F1	3,485; 5,863 (12 - 14,306; 8)	2,900,231; 1,208,707 (2,045,546 - 3,754,916; 2)
F2	260,637; 247,935 (14,698 - 561,934; 7)	788,856; 683,451 (250,975 - 2,147,927; 8)
F3	539,697 (1)	714,814; 420,074 (216,539 - 1,281,582; 8)

*C= control; N= isolates from native amphibian hosts; F= isolates from bullfrogs

Table 3. Proportional Hazard analysis results testing the interaction between infection load and strains in survival of pumpkin toadlets*.

Source	Nparm	Df	L-R χ^2	Prob>ChiSq
Strain	5	5	17.8006587	0.0032*
Loadlog	1	1	6.84387369	0.0089*
Strain*loadlog	5	5	6.58048188	0.2538

* *Effect Likelihood Ratio Tests. Asterisks indicate significant results.*

Figure-Legend

Figure 1. *Bd* prevalence in different developmental stages (tadpole, juvenile and adult) in different sampled farms (a); *Bd* lineages isolated from bullfrogs (b).

Figure 2. *Bd* infection prevalence (%) among the three developmental stages (tadpole, juvenile and adult) (a); *Bd* infection load by developmental stage (juvenile and adult) (b).

Figure 3. Water outflow (black bars) and *Bd* zoospore g.e. (gray bars) released daily by the bullfrog farms into the natural surrounding waterbodies.

Figure 4. Pumpkin toadlet survival curves (%) following inoculation with different strains (a); Mean infection load (log) on day 16 or day of death (for individuals who died before that day) by different strains (b).

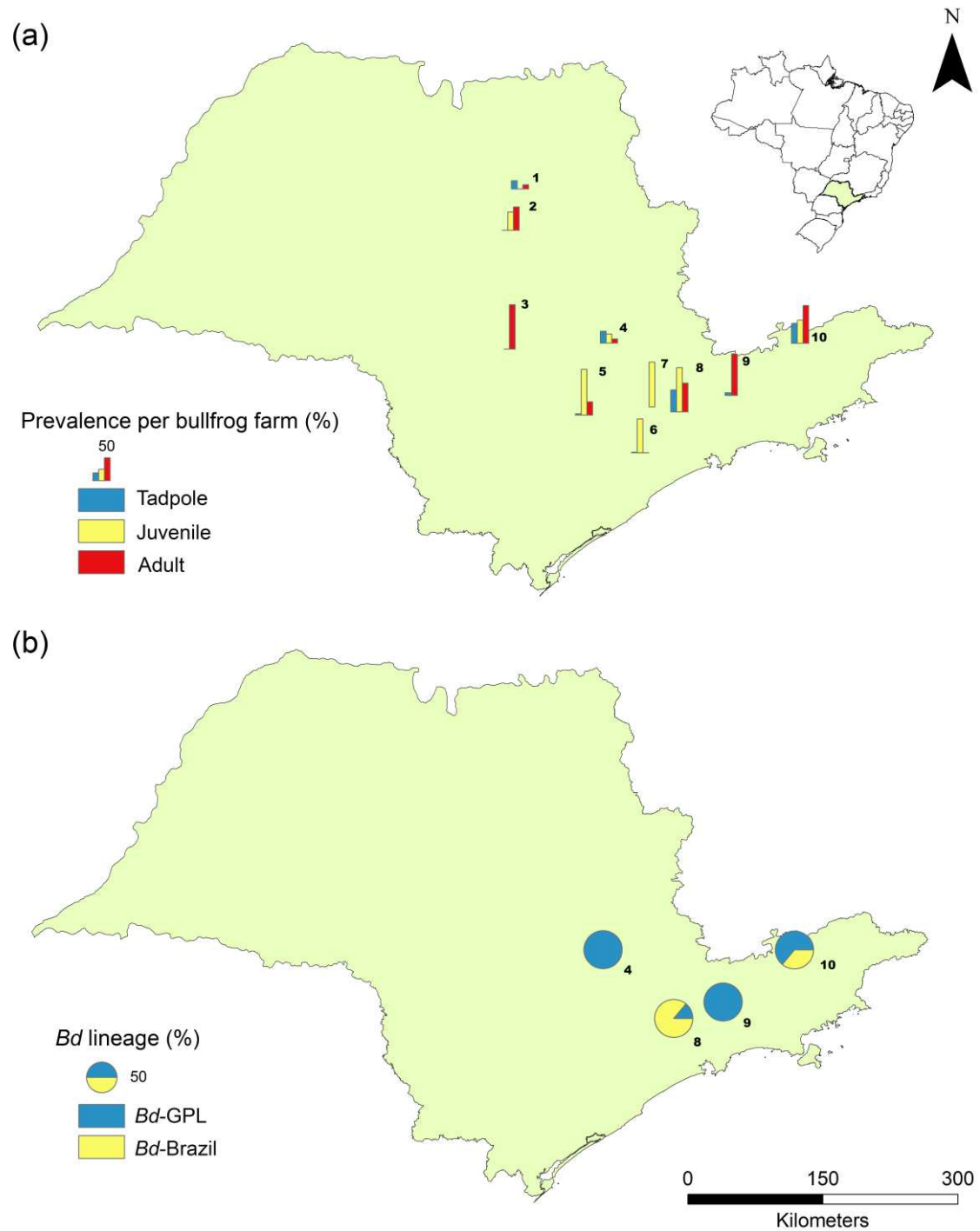


Figure 1. *Bd* prevalence in different developmental stages (tadpole, juvenile and adult) in different sampled farms (a); *Bd* lineages isolated from bullfrogs (b).

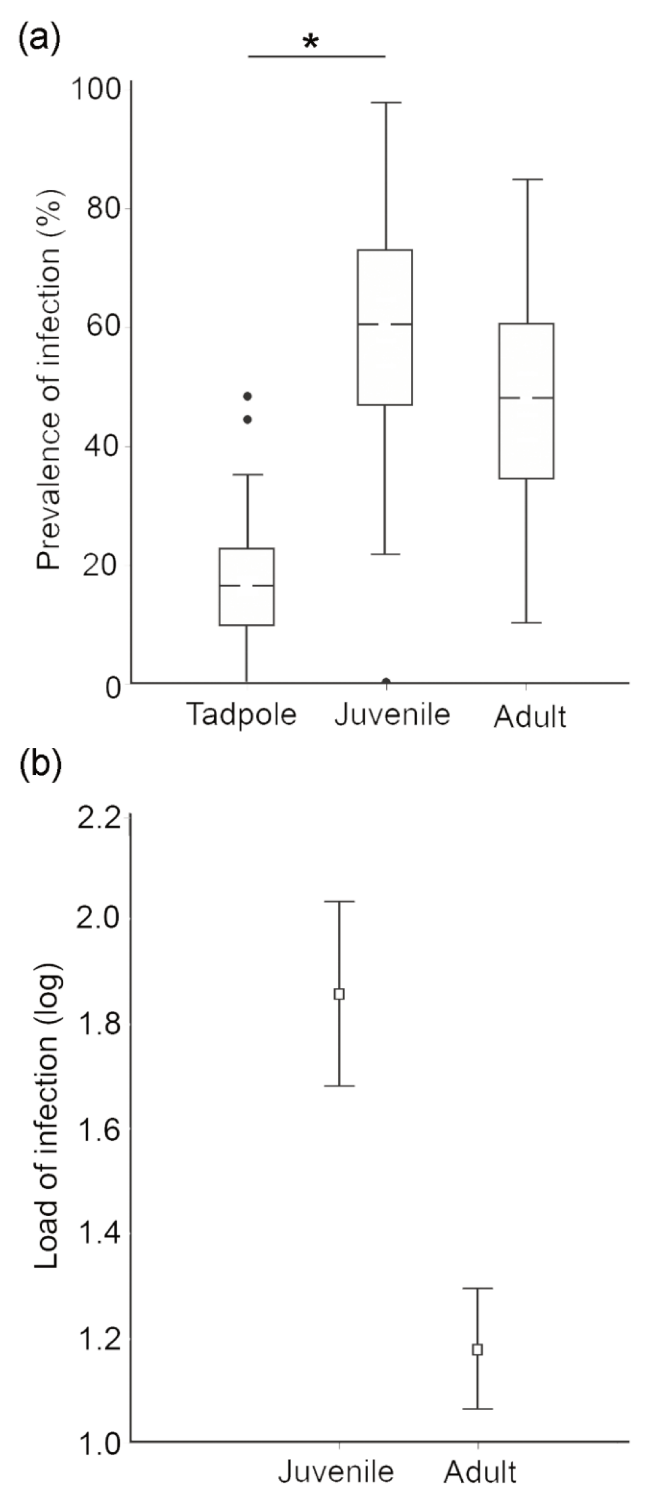


Figure 2. *Bd* infection prevalence (%) among the three developmental stages (tadpole, juvenile and adult) (a); *Bd* infection load by developmental stage (juvenile and adult) (b).

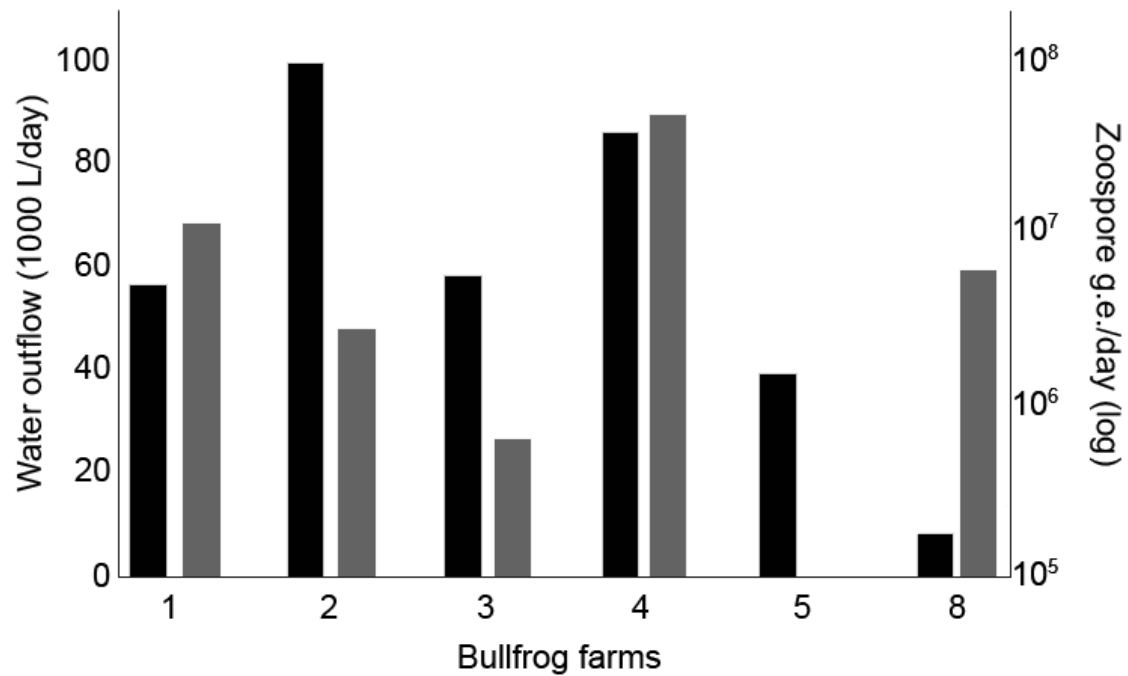


Figure 3. Water outflow (black bars) and *Bd* zoospore g.e. (gray bars) released daily by the bullfrog farms into the natural surrounding waterbodies.

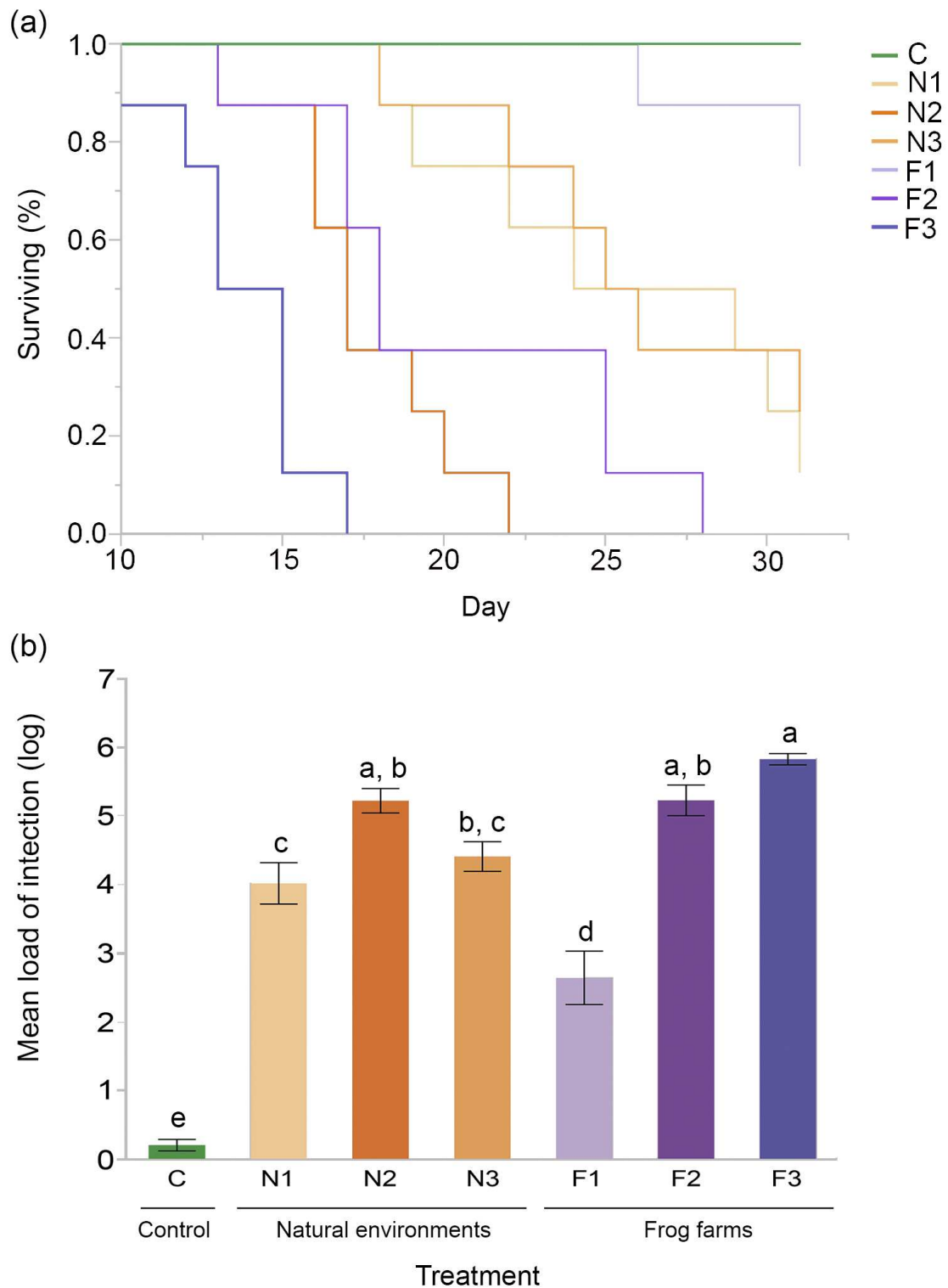


Figure 4. Pumpkin toadlet survival curves (%) following inoculation with different strains (a); Mean infection load (log) on day 16 or day of death (for individuals who died before that day) by different strains (b).

Supporting Information

Multilocus sequence typing (MLST) markers genotyped for this study (Appendix S1), Hosts and origin site of isolated strains used in the laboratory infection experiment (Appendix S2), Pumpkin toadlets *Bd* infection load on days 16, 31, and on the day animals died along the experiment (Appendix S3), System of production of bullfrog farms: Tadpoles sector (a); Juveniles sector (b); Adults sector (c); water released by the farms into the natural environment (d) (Appendix S4), Equipment for water filtration procedure for detection of *Bd* (Appendix S5) are available online. The authors are solely responsible for the content and functionality of these materials. Queries (other than absence of the material) should be directed to the corresponding author.

Supporting Information

Appendix S1. Multilocus sequence typing (MLST) markers genotyped for this study.

Locus	PCR Primers	Anneal Temp.	Source
8009X2	F: 5'-TCGTGAAGAGCTTGGAAGTCG-3' R: 5'-AGTTCTGTCGTCAATGCTGTAGGG-3'	54 °	Morgan <i>et al.</i> 2007
BdC24	F: 5'-GACAATGTGCTCACGGCTTA-3' R: 5'-CTCTCCAAGGCTGAATCTGG-3'	54 °	James <i>et al.</i> 2009
BdSC4.16	F: 5'-TCAACTGGCTTTGAGCACAC-3' R: 5'-ATAGAGCATGCAGATCGCTTT-3'	54 °	Schloegel <i>et al.</i> 2012
R6046	F: 5'-CTATCTGCGCTCCCGTGTCAA-3' R: 5'-AGGGCTGCAACAACCTGGATTT-3'	54 °	Morehouse <i>et al.</i> 2003
BdSC6.15	F: 5'-GACGATAAAACGACAACAATCG-3'	54 °	Schloegel <i>et al.</i> 2012

R: 5'-CCCTTTT TAGGTTGGCTTGC-3'

BdSC8.10 F: 5'-TGACAAAGTGCCGAGTGTTT-3'

54 ° Schloegel *et al.* 2012

R: 5'-TTGGCTATACCCGACTACGC-3'

Appendix S2. Hosts and origin site of isolated strains used in the laboratory infection experiment.

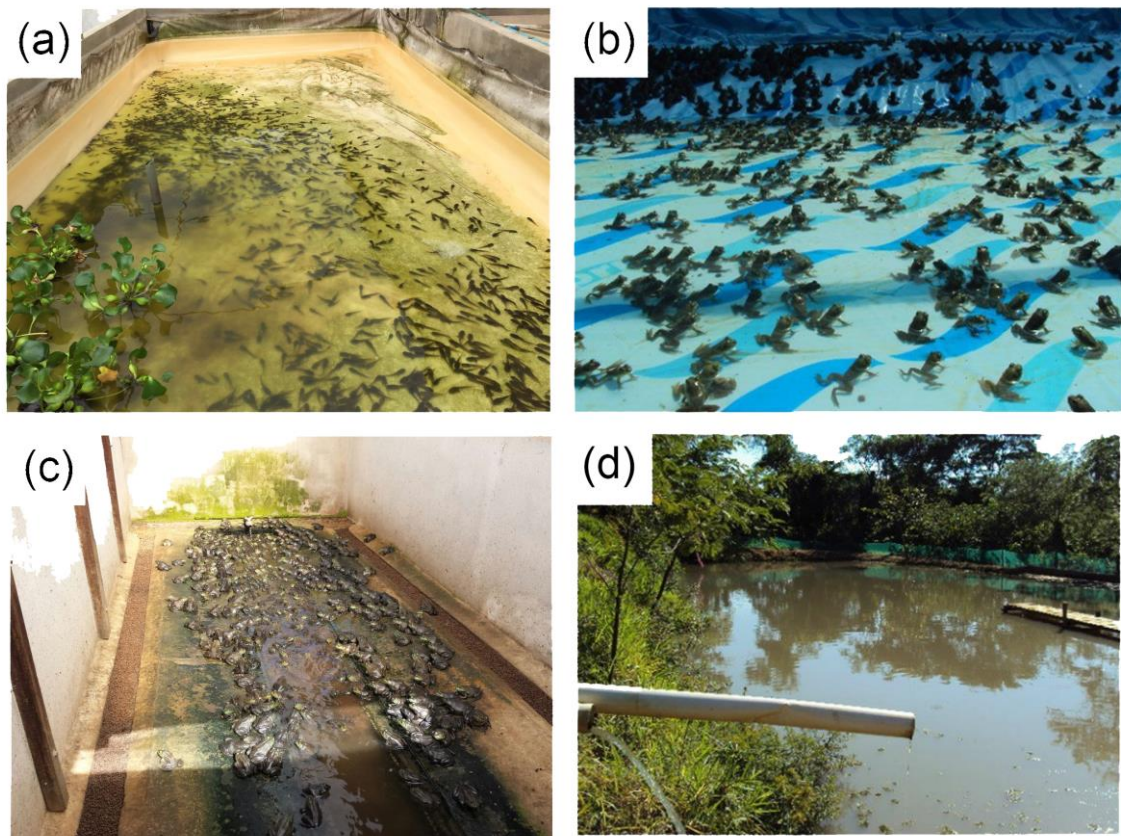
Strains	Host	Municipality, State
N1	Unidentified	Santa Teresa, Espírito Santo
N2	<i>Megaelosia apuana</i>	Alto Caparaó, Minas Gerais
N3	<i>Scinax hiemalis</i>	Jundiaí, São Paulo
F1	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Pindamonhangaba, São Paulo
F2	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Santa Bárbara D'Oeste, São Paulo
F3	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Santa Isabel, São Paulo

Appendix S3. Pumpkin toadlets *Bd* infection load on days 16, 31, and on the day animals died along the experiment*.

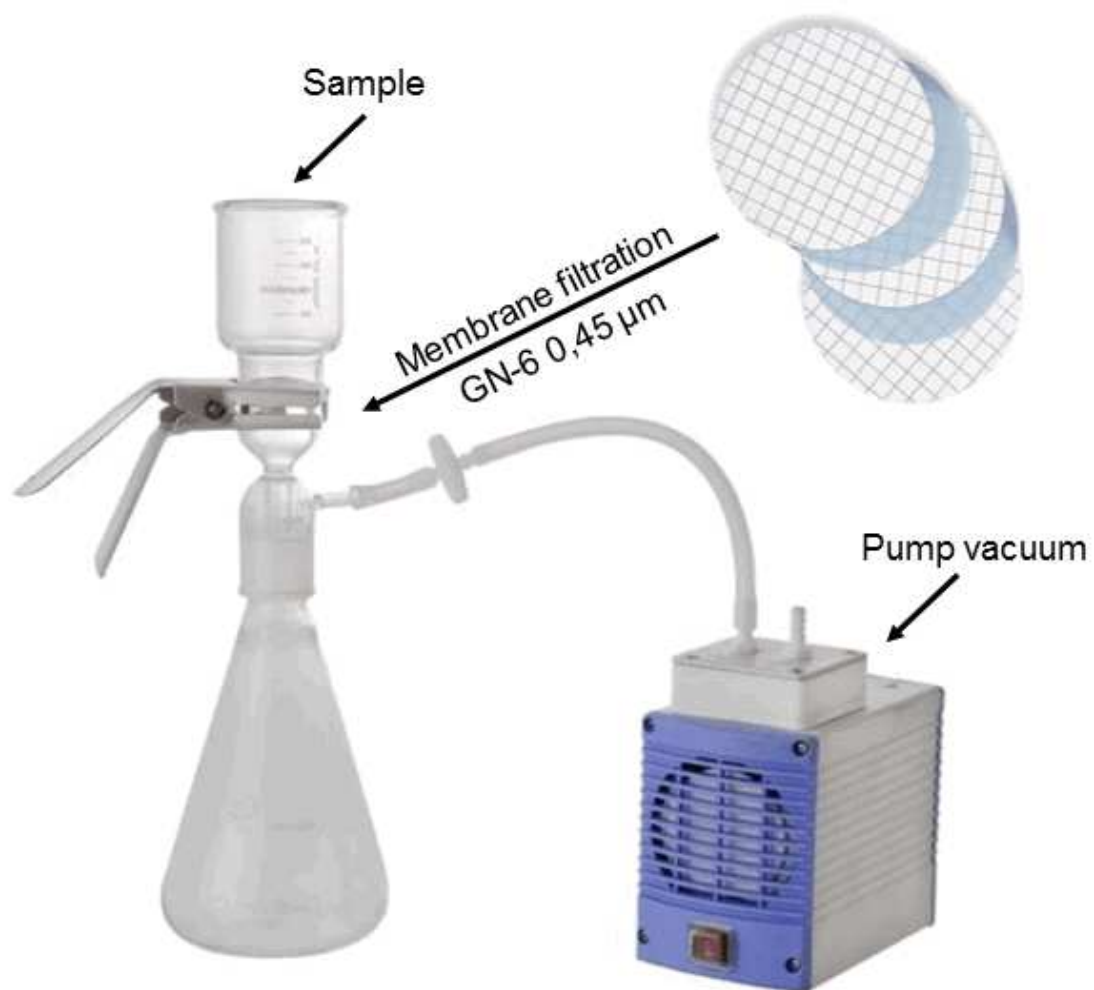
Individual	Treatment	Genotype	Infection load (zoospore g.e.)		
			Day 16	Day 31	Day of death
1	Control	C	0	Not analysed	Survived
2	Control	C	0	Not analysed	Survived
3	Control	C	1	Not analysed	Survived
4	Control	C	0	Not analysed	Survived
5	Control	C	3	Not analysed	Survived
6	Control	C	0	Not analysed	Survived
7	Control	C	0	Not analysed	Survived
8	Control	C	0	Not analysed	Survived
9	Nature	N1	330	9,756	Survived
10	Nature	N1	180,9	Dead	1,786,135 (30)
11	Nature	N1	102,645	Dead	166,029 (18)
12	Nature	N1	8,964	Dead	444,168 (24)
13	Nature	N1	4,329	Dead	1,632,237 (31)
14	Nature	N1	32,826	Dead	1,289,281 (29)
15	Nature	N1	23,999	Dead	299,811 (22)
16	Nature	N1	75,184	Dead	183,578 (19)
17	Nature	N2	26,118	Dead	462,761 (22)
18	Nature	N2	164,616	Dead	657,068 (19)
19	Nature	N2	Dead	Dead	414,355 (16)
20	Nature	N2	Dead	Dead	653,676 (13)
21	Nature	N2	343,459	Dead	656,325 (17)
22	Nature	N2	Dead	Dead	227,470 (16)
23	Nature	N2	33,383	Dead	496,228 (20)
24	Nature	N2	193,779	Dead	945,888 (17)
25	Nature	N3	2,147	Dead	691,309 (31)
26	Nature	N3	8,213	76,299	Survived
27	Nature	N3	9,435	55,530	Survived
28	Nature	N3	102,780	Dead	358,793 (22)
29	Nature	N3	38,641	Dead	1,066,992 (24)
30	Nature	N3	65,673	Dead	470,795 (25)
31	Nature	N3	36,013	Dead	1,465,878 (26)
32	Nature	N3	120,497	Dead	104,653 (18)
33	Farm	F1	77	20	Survived
34	Farm	F1	325	195,952	Survived
35	Farm	F1	12	0	Survived
36	Farm	F1	14,306	Dead	2,045,546 (31)
37	Farm	F1	11,472	Dead	3,754,916 (26)
38	Farm	F1	38	8,623	Survived
39	Farm	F1	766	14,937	Survived
40	Farm	F1	884	17,904	Survived
41	Farm	F2	Dead	Dead	773,820 (13)
42	Farm	F2	547,360	Dead	396,831 (17)

Individual	Treatment	Genotype	Infection load (zoospore g.e.)		
			Day 16	Day 31	Day of death
43	Farm	F2	561,934	Dead	266,903 (17)
44	Farm	F2	14,699	Dead	2,147,927 (28)
45	Farm	F2	39,210	Dead	1,486,504 (25)
46	Farm	F2	91,081	Dead	250,975 (25)
47	Farm	F2	452,991	Dead	646,158 (18)
48	Farm	F2	117,189	Dead	341,727 (18)
49	Farm	F3	539,697	Dead	216,539 (17)
50	Farm	F3	Dead	Dead	735,149 (10)
51	Farm	F3	Dead	Dead	303,891 (13)
52	Farm	F3	Dead	Dead	388,178 (12)
53	Farm	F3	Dead	Dead	523,255 (15)
54	Farm	F3	Dead	Dead	1,131,023 (13)
55	Farm	F3	Dead	Dead	1,281,582 (15)
56	Farm	F3	Dead	Dead	1,138,894 (15)

**The number in parenthesis on the day of death represents the day the animal died.*



Appendix S4. System of production of bullfrog farms. Tadpoles sector (a); Juveniles sector (b); Adults sector (c); water released by the farms into the natural environment (d).



Appendix S5. Equipment for water filtration procedure for detection of *Bd*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso trabalho evidenciamos que os ranários podem funcionar como potencial disseminador do fungo quitrídio. Além de altas prevalências e cargas de infecção encontradas nas rãs touro e na água utilizada para sua criação, vimos também que os ranários abrigam uma grande variedade de cepas de *Bd*, que também apresentam uma grande variação na virulência, quando comparado com cepas isoladas de espécies nativas brasileiras. A falta de ações e legislações para a criação e comercialização desses animais implica em grandes problemas que podem afetar populações de anuros nativos, como a fuga das rãs dos estabelecimentos, o despejo de água contaminada com *Bd* para ambientes naturais e até mesmo comércio internacional de indivíduos infectados por diferentes cepas de *Bd*.

Os resultados encontrados têm grande relevância e importância para a comunidade acadêmica, mas principalmente para autoridades e órgãos com poder de tomar decisões a respeito da conservação da biodiversidade nativa. Mais uma vez salientamos a necessidade de implementação de medidas de controle e/ou erradicação de *Bd* em ranários. Medidas como assegurar que os animais não fujam dos estabelecimentos durante todo o processo de produção, tratamento de animais infectados, tratamento e descarte correto de resíduos da produção e água e comércio das rãs limpas e congeladas deveriam ser regulamentadas e implementadas nos ranários.

A partir das contribuições desse trabalho, ressaltamos que medidas e ações para erradicação de quitrídio nos ranários devem ser planejadas e implementadas. Embora haja protocolos de tratamento de animais infectados com *Bd*, esse varia de acordo com a espécie e com o grau de virulência das cepas, e não há uma dosagem ou duração do tratamento específico para rã touro, tampouco para as cepas que possivelmente estão sofrendo grandes variações genéticas. Além disso, um protocolo de tratamento da água que eliminasse o fungo dos ranários seria essencial. Esperamos que este trabalho seja capaz de evidenciar esse problema, que influencie em políticas públicas e fundamente a formulação de legislação sobre a ranicultura nacional. Só assim, avançaremos na conservação dos anfíbios nativos brasileiros.

REFERÊNCIAS

- Akani GC, Luiselli L, Angelici FM, Politano E. 1998. Bushmen and herpetofauna: notes on amphibians and reptiles traded in bush-meat markets of local people in the Niger Delta (Port Harcourt, Rivers State, Nigeria). *Anthropozoologica* **27**:21-26.
- Altherr S, Goyenechea A, Schubert DJ. 2011. Canapés to extinction - the international trade in frogs' legs and its ecological impact. A report by Pro Wildlife, Defenders of Wildlife and Animal Welfare Institute editors. Munich (Germany), Washington D.C. (USA).
- AmphibiaWeb. 2018. University of California, Berkeley, CA, USA. Available from <https://amphibiaweb.org> (accessed March 2018).
- Barrasso DA, Cajade R, Nenda SJ, Baloriani G, Herrera R. 2009. Introduction of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) in natural and modified environments: an increasing conservation problem in Argentina. *South American Journal of Herpetology* **4**:69-75.
- Bataille A, Fong JJ, Cha M, Wogan GOU, Baek HJ, Lee H, Min M-S, Waldman B. 2013. Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology* **22**:4196-4209.
- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Batista RF, Prado PI. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* **318**:1775-1777.
- Becker CG, et al. 2017. Variation in phenotype and virulence among enzootic and panzootic amphibian chytrid lineages. *Fungal Ecology* **26**:45-50.
- Berger L, et al. 1998. Cytridiomycosis 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* **95**:9031-9036.
- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* **68**:51-63.
- Boone MD, Little EE, Semlitsch RD. 2004. Overwintered bullfrog tadpoles negatively affect salamanders and anurans in native amphibian communities. *Copeia* **2004**:683-690.

- Both C, Lingnau R, Santos-Jr A, Madalozzo B, Lima LP, Grant T. 2011. Widespread occurrence of the American bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. *South American Journal of Herpetology* **6**:127-134.
- Both C, Grant T. 2012. Biological Invasions and the acoustic niche: the effect of bullfrog calls on the acoustic signals of white-banded tree frogs. *Biology Letters* **8**:714-716.
- Braz Filho M. 2001. Dicas para quem quer entrar para o ramo da Ranicultura. Portal do Agronegócio. Available from <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=7250> (accessed November 2016).
- Brito MFG., Magalhães ALB, Lima-Junior DP, Pelicice FM, Azevedo-Santos VM, Garcia DAZ, Cunico AM, Vitule JRS. 2018. Brazil naturalizes non-native species. *Science* **361**:139-139.
- Carpenter AI, Dublin H, Lau M, Syed G, McKay JE, Moore RD. 2007. Over-harvesting. Pages 26-31 in Gascon C, Collins J, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson JR editors. *Amphibian conservation action plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Carpenter AI, Andreone F, Moore RD, Griffiths RA. 2014. A review of the international trade in amphibians: the types, levels and dynamics of trade in CITES-listed species. *Oryx* **48**:565-574.
- Carvalho T, Becker CG, Toledo LF. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proceedings of the Royal Society B* **284**:20162254.
- Catenazzi A, Lehr E, Rodriguez LO, Vredenburg VT. 2011. *Batrachochytrium dendrobatidis* and the collapse of anuran species richness and abundance in the upper Manu National Park, southeastern Peru. *Conservation Biology* **25**:382-391.
- Chettri B, Acharya BK, Bhupathy S. 2011. An overview of the herpetofauna of Sikkim with emphasis on the elevational distribution pattern and threats and conservation issues. Pages 233-254 in Arrawatia ML, Tambe S editors. *Biodiversity of Sikkim: Exploring and Conserving a Global Hotspot*. Information and Public Relations Department, Government of Sikkim, Gangtok, India.

- Collins JP, Crump ML, Lovejoy TE. 2009. Extinction in our times: Global amphibian decline. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* **5**:735-748.
- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, Longcore JE, Brown CC, Porter D. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal* **14**:201-207.
- DeMarchi JA, Gaston JR, Spadaro AN, Porterfield CA, Venesky MD. 2015. Tadpole food consumption decreases with increasing *Batrachochytrium dendrobatidis* infection intensity. *Journal of Herpetology* **49**:395-398.
- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015. Available from <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2773050/pesquisa-investe-em-ra-desenvolve-produtos-manual-e-cria-rede-de-cooperacao> (accessed April 2017).
- Eskew EA, Worth SJ, Foley JE, Todd BD. 2015. American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) resist infection by multiple isolates of *Batrachochytrium dendrobatidis*, including one implicated in wild mass mortality. *EcoHealth* **12**:513-518.
- FAO (Food and Agriculture Organization) 2005-2018. 2018. Cultured Aquatic Species Information Programme - *Rana catesbeiana*. Text by Flores Nava A. In FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. Available from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en (accessed April 2018).
- Farrer RA, et al. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:18732-18736.
- Feix RD, Abdallah PR, Figueiredo MRC. 2004. Análise econômica da criação de rãs em regiões de clima temperado. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural 52.

- Fernández-Loras A, Fernández-Beaskoetxea S, Arriero E, Fisher MC, Bosch J. 2017. Early exposure to *Batrachochytrium dendrobatidis* causes profound immunosuppression in amphibians. *European Journal of Wildlife Research* **63**:99.
- Ferreira CM, Pimenta AGC, Paiva-Neto JS. 2002. Introdução à ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca* **33**:1-15.
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C. 2007. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species – the American bullfrog. *Diversity and Distributions* **13**:476-485.
- Figueiredo RB. 2005. A ranicultura no Brasil é renda certa para o produtor. *Revista Eletrônica Nordeste Rural*. Available from <http://www.nordesterrural.com.br/nordesterrural/matler.asp?newsId=2291> (accessed December 2017).
- Fisher MC, Garner TW. 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews* **21**:2-9.
- Fisher MC, et al. 2009. Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology* **18**:415-429.
- Fites JS, et al. 2013. The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science* **342**:366-369.
- Flores Nava A. 2005. Cultured aquatic species information programme. *Rana catesbeiana*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Fontanello D, Arruda Soares H, Mandelli Jr. J, Santos LE, Penteado LA, Campos BES, Reis JM. 1984. Estação de reprodução da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, criadas em ranário comercial e a influência de fatores climáticos sobre o número de desovas. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca* **11**:123-130.
- Fontanello D, Wirz RR, Penteado LA, Campos BES, Mandelli Jr. J, Arruda Soares H. 1988. Ganho de peso de Rãs-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw), criadas em gaiolas de diferentes tamanhos. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca* **15**:45-49.
- Fontanello D, Wirz RR, Arruda Soares H, Campos BES, Freitas EAN, Ferreira CM. 1993. Comparação de quatro sistemas de engorda de Rãs-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802): Tanque-Ilha, Confinamento, Anfigranja e Gaiolas. 1 -

- Desenvolvimento ponderal; 2 - Custo operacional. Boletim Técnico do Instituto de Pesca **20**:43-58.
- Forti LR, Becker CG, Tacioli L, Pereira VR, Santos ACF, Oliveira I, Haddad CFB, Toledo LF. 2017. Perspectives on invasive amphibians in Brazil. PLoS One **12**:e0184703.
- Frost DR. 2018. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Available from <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accessed March 2018).
- Garcia PCA, et al. 2009. Anfíbios. Pages 329-347 in Bressan PM, Kierulff MCM, Sugieda AM, editors. Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo.
- Garner TW, Perkins MW, Govindarajulu P, Seglie D, Walker S, Cunningham AA, Fisher MC. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. Biology letters **2**:455-459.
- Gervasi S, Gondhalekar C, Olson DH, Blaustein AR. 2013a. Host identity matters in the amphibian-*Batrachochytrium dendrobatidis* system: fine-scale patterns of variation in responses to a multi-host pathogen. PLoS One **8**:e54490.
- Gervasi SS, Urbina J, Hua J, Chestnut T, Relyea RA, Blaustein AR. 2013b. Experimental evidence for American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Eco Health **10**:166-171.
- Ghosh P, Fisher MC. 2016. Dr Jekyll and Mrs Hyde: Risky hybrid sex by amphibian-parasitizing chytrids in the Brazilian Atlantic Forests. Molecular Ecology **25**:2961-2963.
- Ghosh S. 2018. Frogs in Sikkim Himalayas threatened by extraction for meat, allegedly of medicinal value. Mongabay, India. Available from <https://india.mongabay.com/2018/03/27/frogs-in-sikkim-himalayas-threatened-by-extraction-for-meat-allegedly-of-medicinal-value/> (accessed April 2018).

- Giovanelli JGR, Haddad CFB, Alexandrino J. 2008. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. *Biological Invasions* **10**:585-590.
- GISD (Global Invasive Species Database). 2018. Available from <http://193.206.192.138/gisd/search.php> (accessed March 2018).
- Goka K, Yokoyama JUN, Une Y, Kuroki T, Suzuki K, Nakahara M, Kobayashi A, Inaba S, Mizutani T, Hyatt AD. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology* **18**:4757-4774.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**:183-190.
- Greenspan SE, Longcore JE, Calhoun AJ. 2012. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. *Diseases of aquatic organisms* **100**:201-210.
- Greenspan SE, Lambertini C, Carvalho T, James TY, Toledo LF, Haddad CFB, Becker CG. 2018. Hybrids of amphibian chytrid show high virulence in native hosts. *Scientific reports* **8**:9600.
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA, Loebmann D, Gasparini JL, Sazima I. 2013. *Guia de anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia*. São Paulo: Anolisbooks:544.
- Hamilton WD. 1980. Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* **35**:282-290.
- Hanselmann R, Rodriguez A, Lampo M, Fajardo-Ramos L, Aguirre AA, Kilpatrick AM, Rodrigues JP, Daszak P. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation* **120**:115-119.
- Heyer WR, Rand AS, da Cruz CAG, Peixoto OL. 1988. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica* **20**:230-235.
- Hirschfeld M, Blackburn DC, Doherty-Bone TM, Gonwouo LN, Ghose S, Rödel MO. 2016. Dramatic declines of montane frogs in a Central African biodiversity hotspot. *PLoS One* **11**:e0155129.
- Hof C, Araújo MB, Jetz W, Rahbek C. 2011. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature* **480**:516-519.

- IUCN (International Union for the Conservation of Nature). 2004. The IUCN Red List of Threatened Species. Available from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T5263A11121365.en> (accessed March 2018).
- James TY, Stenlid J, Olson A, Johannesson H. 2008. Evolutionary significance of imbalanced nuclear ratios within heterokaryons of the basidiomycete fungus *Heterobasidion parviporum*. *Evolution* **62**:2279-2296.
- James TY, et al. 2015. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution* **5**:4079-4097.
- Jenkinson TS, et al. 2016. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. *Molecular Ecology* **25**:2978-2996.
- Jennings MR, Hayes MP. 1985. Pre-1900 overharvest of California red-legged frogs (*Rana aurora draytonii*): The inducement for bullfrog (*Rana catesbeiana*) introduction. *Herpetologica* **41**:94-103.
- Kats LB, Ferrer RP. 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* **9**:99-110.
- Kiesecker JM, Blaustein AR, Miller CL. 2001. Potential mechanisms underlying the displacement of native red-legged frogs by introduced bullfrogs. *Ecology* **82**:1964-1970.
- King KC, Stelkens RB, Webster JP, Smith DF, Brockhurst MA. 2015. Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. *PLoS pathogens* **11**:e1005098.
- Kinney VC, Heemeyer JL, Pessier AP, Lannoo MJ. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: Affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". *PLoS One* **6**:e16708.
- Knapp RA, Morgan JAT. 2006. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia* **2006**:188-197.
- Kraus F. 2015. Impacts from Invasive Reptiles and Amphibians. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **46**:75-97.

- Kruger KM, Hiner HB, Hyatt AD, Boyle DG, Hero JM. 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* **71**:141-148.
- Kruger KM, Hero J. 2009. Chytridiomycosis, Amphibian Extinctions, and Lessons for the Prevention of Future Panzootics. *EcoHealth* **6**:6-10.
- Lambertini C, Rodriguez D, Brito FB, Leite DS, Toledo LF. 2013. Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira* **2**:12-17.
- Lambertini C, Becker CG, Jenkinson TS, Rodriguez D, Leite DS, James TY, Zamudio KR, Toledo LF. 2016. Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. *Fungal Ecology* **20**:15-21.
- Lau M, van Dijk PP, Syed GP. 2008. Managing problems of overexploitation and trade in amphibians. In Stuart S, Hoffmann M, Chanson J, Cox N, Berridge R, Ramani P, Young B, editors. *Threatened Amphibians of the World*, Lynx Edicions, Barcelona.
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R. 2008. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biological Invasions* **10**:1183-1189.
- Leivas PT, Savaris M, Lampert S, Lucas EM. 2013. Predation of *Odontophrynus americanus* (Anura: Odontophrynidae) by the invasive species *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) in an Araucaria Forest remnant in Southern Brazil. *Herpetology Notes* **6**:603-606.
- Lima SL, Agostinho CA. 1988. Sistema Anfigranja de criação de rãs. In: Encontro Nacional de Ranicultura, Rio de Janeiro **6**:15-27.
- Lima SL, Cruz TA, Moura AM. 1999. Ranicultura: Análise da cadeia produtiva. Ed. Folha de Viçosa, Viçosa:172.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* **91**:219-227.
- Loyola RD, Nabout JC, Trindade-Filho J, Lemes P, Cardona JNU, Dobrovolski R, Sagnori MD, Diniz-Filho JAF. 2012. Climate change might drive species into reserves: a case study of the American bullfrog in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. *Alytes* **29**:61-74.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental pollution* **157**:2903-2927.

- Mazzoni R, Carnevia D, Altieri W, Matsumura Y. 1996. Cría de ranas en “Sistema Inundado”, experiencias en ranarios comerciales. Boletín del Instituto de Investigaciones Bibliográficas, Mexico **13**:43-51.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, Apolo A, Perdomo E, Speranza G. 2003. Emerging pathogen in wild amphibians and frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. Emerging Infectious Diseases **9**:995-998.
- McMenamin SK, Hadly EA, Wright CK. 2008. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. Proceedings of the national Academy of Sciences **105**:16988-16993.
- Medeiros CI, Both C, Grant T, Hartz SM. 2017. Invasion of the acoustic niche: variable responses by native species to invasive American bullfrog calls. Biological invasions **19**:675-690.
- Mesquita AF, Lambertini C, Lyra M, Malagoli LR, James TY, Toledo LF, Haddad CFB, Becker CG. 2017. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. Scientific reports **7**:16605.
- Monastersky R. 2014. Life – a status report. Nature **516**:158-161.
- Moreno LF, Morão P, Toledo LF. 2015. Tratamento de anfíbios infectados pelo fungo quitrídio do gênero *Batrachochytrium*. Herpetologia Brasileira **4**:30-34.
- Myers N. 2003. Biodiversity hotspots revisited. BioScience **53**:916-917.
- O'Hanlon SJ, et al. 2018. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. Science **360**:621-627.
- OIE (World Organisation for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals). Chapter 2.1.1. Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis*. Available from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.1.01_INF_BATRACHOCHYTRIUM.pdf (accessed December 2017).
- Oliveira GA. 1983. Instalação de ranários. In: Encontro Nacional de Ranicultores **3**:41-58.
- Olson Å, Stenlid J. 2001. Plant pathogens: mitochondrial control of fungal hybrid virulence. Nature **411**:438.
- Olson DH, Ronnenberg KL. 2014. Global *Bd* mappingproject: 2014 update. FrogLog, **111**:17-21.

- Oza GM. 1990. Ecological effects of the frog's legs trade. *Environmentalist* **10**:39-42.
- Pessier AP, Nichols DK, Longcore JE, Fuller MS. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **11**:194-199.
- Pounds JA, et al. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* **439**:161-167.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of aquatic organisms* **61**:75-83.
- Rodrigues CAG, Quartaroli CF, Cribb AY, Belluzzo AP. 2010. Áreas potenciais para a criação de rã-touro gigante *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) na região Sudeste do Brasil. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento:1-37.
- Rollins-Smith LA. 1998. Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological reviews* **166**:221-230.
- Rosenblum EB, Voyles J, Poorten TJ, Stajich JE. 2010. The deadly chytrid fungus: A story of an emerging pathogen. *PLoS Pathogens* **6**:e1000550.
- Rosenblum EB, et al. 2013. Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:9385-9390.
- Salla RF, et al. 2015. Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. *Journal of Experimental Zoology* **323A**:487-496.
- Savage AE, Becker CG, Zamudio KR. 2015. Linking genetic and environmental factors in amphibian disease risk. *Evolutionary applications* **8**:560-572.
- Schlaepfer MA, Hoover C, Dodd Jr CK. 2005. Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *BioScience* **55**:256-264.
- Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, Davies AJ, Hyatt AD, Daszak P. 2009. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation* **142**:1420-1426.
- Schloegel L, et al. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology* **21**:5162-5177.

- SEBRAE. 1999. Série perfil de projetos ranicultura. Vitória, Espírito Santo.
- Segalla MV, Caramaschi U, Cruz CA, Garcia PCA, Grant T, Haddad CFB, Langone J. 2014. Brazilian amphibians-List of species. *Herpetologia Brasileira* **3**:27-48.
- Silva PB, Bordignon AC, Silva LF, Oliveira LP, Silva GH, Oliveira SSS, Trentim TAB. 2013. Criação de rã: estudo de viabilidade econômica para implantação de ranário na região de Mogi Mirim/SP-2009. *UNIVERSITAS* **3**:97-119.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinction worldwide. *Science* **306**:1783-1786.
- Teixeira RD, Mello SCP, Santos CAL. 2001. The world market for frog legs. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Globefish Research Program **82**:1-44. Rome, Italy.
- Thomas A, Biju SD. 2015. Tadpole consumption is a direct threat to the endangered purple frog, *Nasikabatrachus sahyadrensis*. *Salamandra* **51**:252-258.
- Van Valen L. 1977. The red queen. *The American Naturalist* **111**:809-810.
- Vieira MI. 1993. Rã-touro gigante: características e Reprodução. INFOTEC. 4 ed.
- Vieira CA, Toledo LF. 2012. Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira* **1**:18-19.
- Vieira CA, Toledo LF, Longcore JE, Longcore JR. 2013. Body length of *Hylodes cf. ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. *Brazilian Journal of Biology* **73**:195-199.
- Voyles J, Berger L, Young S, Speare R, Webb R, Warner J, Skerratt LF. 2007. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms* **77**:113-118.
- Voyles J, Rosenblum EB, Berger L. 2011. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection* **13**:25-32.
- Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:9689-9694.

- Warkentin IG, Bickford D, Sodhi NS, Bradshaw CJ. 2009. Eating frogs to extinction. *Conservation Biology* **23**:1056-1059.
- Weygoldt P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **24**:249-255.
- Whaley WG. 1944. Heterosis. *The Botanical Review* **10**:461-498.

ANEXOS

Anexo I. Autorização do SISBio para coleta de animais 1

Anexo II. Autorização do SISBio para coleta de animais 2

Anexo III. Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNICAMP)

Anexo IV. Declaração de Bioética/Biossegurança

Anexo V. Declaração de Direitos Autorais

Anexo I.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-13	Data da Emissão: 06/10/2016 15:18	Data para Revalidação*: 05/11/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: LUÍS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA	CPF: 289.618.908-40
Título do Projeto: Historia Natural de Anfíbios no Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	captura e coleta de animais em campo	06/2014	06/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contatar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	1) Para o sacrifício dos exemplares eventualmente coletados sugerimos a utilização dos métodos recomendados pela Resolução nº 1000/2012-CFMV e/ou Resolução nº 301/2012-CFBio; 2) A quantidade de anfíbios desta Autorização refere-se a adultos e girinos; 3) Esta Autorização não contempla a coleta de espécimes de anfíbios para a Ilha de Alcatrazes, mas somente colheitas de amostras do fungo quitrídio; 4) Os artigos científicos referentes a este projeto e publicados até o presente momento (19/09/2016) devem ser anexados a esta solicitação.
2	O pesquisador deverá entrar em contato com a unidade de conservação previamente ao início dos trabalhos de campo com o objetivo de comunicar o início dos trabalhos de pesquisa.
3	1. O AGENDAMENTO das atividades de campo no Parque Nacional do Caparaó (PNC) deverá ser realizado com a ANTECEDÊNCIA MÍNIMA DE 15 DIAS. 2. Estudantes de pós-graduação que porventura venham a utilizar os dados em suas Teses e, ou, Dissertações, deverão submeter suas próprias Solicitações, conforme orientação do SISBIO. 3. Proceder à retirada das armadilhas imediatamente após seu uso e o quantitativo de coletas a ser realizado no PNC deverá ser discutido e acordado entre o pesquisador e a equipe da Unidade antes do início das atividades de campo. 4. Publicações e similares deverão ser remetidas diretamente para o PNC e solicita-se a disponibilização de imagens registradas a fim de serem utilizadas em atividades do Parque, garantindo-se a indicação da autoria na veiculação.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18681384



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-13	Data da Emissão: 06/10/2016 15:18	Data para Revalidação: 05/11/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: LUÍS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA	CPF: 289.618.908-40
Título do Projeto: Historia Natural de Anfíbios no Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

4	O pesquisador deverá: (1) Contatar a UC com antecedência para planejamento de trabalho de campo; (2) Disponibilizar relatórios das expedições de campo durante os 3 anos de estudo; (3) Fornecer lista de espécimes coletados e registrados com coordenadas geográficas e características do sítio de coleta/registro; (4) Realizar registro de presença e ausência dos táxons estudados em toda a área das formações da UC; (5) O pesquisador não deverá realizar captura de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção.
5	Os pesquisadores estrangeiros Camila Inês Zornosa Torres, Thomas S. Jenkinson, Anat Belasen, que possuem o vínculo de Portador de visto permanente no Brasil. Já o pesquisador Timothy Yong James possui vínculo de Programa de professor visitante estrangeiro na UNICAMP. Todos estão dispensados de autorização do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Mirtis Maria Giadani Ferraz	Bióloga do Laboratório	077.825.468-26	14100119 SSP-SP	Brasileira
2	Meghi Nogueira de Souza	Colaborador	368.786.878-88	41743697x SSP-SP	Brasileira
3	DOMINGOS DA SILVA LEITE	Pesquisador	018.488.478-54	9181567-7 SSP-SP	Brasileira
4	Tamille Carvalho	Colaborador	367.720.108-09	457150567 SSP-SP	Brasileira
5	Camila Inês Zornosa Torres	Colaboradora	236.898.378-39	V996846-U DPF-SP	Estrangeira
6	Carolina Lambertini	Pesquisadora	360.051.528-40	322095918 SSP-SP	Brasileira
7	Timothy Yong James	Pesquisador		471886362 USA PASSPO-SP	Estrangeira
8	Tami Mott	Pesquisador	130.907.658-88	25060008-0 SSP-SP	Brasileira
9	Thomas S. Jenkinson	Pesquisador		469837405 USA PASSPO-SP	Estrangeira
10	Anat Belasen	Pesquisadora		1050247584 USA PASSPO-	Estrangeira
11	GUILHERME AUGUSTO ALVES	Pesquisador	401.739.638-03	360119335 SSP-SP	Brasileira
12	Luisa de Pontes Ribeiro	Pesquisador	384.418.958-05	468227131 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		AC	Todo Estado	Fora de UC Federal
2		AL	Todo Estado	Fora de UC Federal
3		BA	Todo o Estado	Fora de UC Federal
4		ES	todo o território do Estado	Fora de UC Federal
5		GO	Todo Estado	Fora de UC Federal
6		MG	Todo o Estado	Fora de UC Federal
7		PR	Região Costeira	Fora de UC Federal
8		RS	Região costeira e serras	Fora de UC Federal
9		SP	Estado todo	Fora de UC Federal
10		SC	Região Costeira e Planícies	Fora de UC Federal
11		MG	PÁRQUE NACIONAL DE CAPARAÓ	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Amphibia (*Ótde: 10)
2	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Batrachochytrium

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18681384



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-13	Data da Emissão: 06/10/2016 15:18	Data para Revalidação*: 05/11/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: LUIS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA	CPF: 289.618.908-40
Título do Projeto: Historia Natural de Anfíbios no Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas (amostra de pele por swab)
2	Amostras biológicas (Fungos)	Outras amostras biológicas (fungo quitrA-dio)
3	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Peneira, Puça, Armadilha de queda "pit fall"
4	Método de captura/coleta (Fungos)	Outros métodos de captura/coleta (Raspagem por swab)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18681384



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-13	Data da Emissão: 06/10/2016 15:18	Data para Revalidação*: 05/11/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: LUÍS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA	CPF: 289.618.908-40
Título do Projeto: Historia Natural de Anfíbios no Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18681384



Página 4/4

Anexo II.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54656-3	Data da Emissão: 05/04/2017 16:20	Data para Revalidação*: 05/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Luisa de Portes Ribeiro	CPF: 384.418.958-05
Título do Projeto: O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da fauna nativa	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de swabs (pele de anfíbios anuros) e grãos infectados com o fungo Bd.	08/2016	08/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JUQUITIBA	SP	Juquitiba	Fora de UC Federal
2	PINDAMONHANGABA	SP	Pindamonhangaba	Fora de UC Federal
3	BOTUCATU	SP	Botucatu	Fora de UC Federal
4	MATAO	SP	Matao	Fora de UC Federal
5	JABOTICABAL	SP	Jaboticabal	Fora de UC Federal
6	SAO ROQUE	SP	São Roque	Fora de UC Federal
7	ARACOIABA DA SERRA	SP	Aracoiaba da Serra	Fora de UC Federal
8	SANTA BARBARA D'OESTE	SP	São Bárbara D'Oeste	Fora de UC Federal
9	MOGI DAS CRUZES	SP	Mogi das Cruzes	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Anura

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 19442784



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54656-3	Data da Emissão: 05/04/2017 16:20	Data para Revalidação*: 05/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Luisa de Pontes Ribeiro	CPF: 384.418.958-05
Título do Projeto: O cutrídido nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da fauna nativa	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Anura
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anura (*Qtde: 10)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 19442784



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54656-3	Data da Emissão: 05/04/2017 16:20	Data para Revalidação: 05/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Luisa de Pontes Ribeiro	CPF: 384.418.958-05
Título do Projeto: O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da fauna nativa	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 19442784



Página 3/3

Anexo III.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da fauna nativa, registrada com o nº 4397-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Luis Felipe Toledo e Luisa de Pontes Ribeiro, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 03 de novembro de 2016.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/11/2016-01/11/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbio / <i>Lithobates catesbeianus</i>
No. de animais:	100
Peso / Idade:	01 ano / 300g
Sexo:	50 machos / 50 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbio / <i>Lithobates catesbeianus</i>
No. de animais:	06
Peso / Idade:	01 mês / 01g
Sexo:	03 machos / 03 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbio / Espécies de anuros nativas
No. de animais:	20
Peso / Idade:	01 ano / 200g
Sexo:	10 machos / 10 fêmeas
Origem:	Ranários e entorno dos ranários para espécies nativas no Estado de São Paulo (em estudo)

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 03 de novembro de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo IV.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*O quitridio nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da anurofauna nativa*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Luisa Ribeiro
Nome do(a) aluno(a): Luisa de Pontes Ribeiro

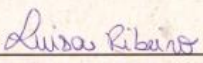
Assinatura: [Assinatura]
Nome do(a) orientador(a): Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira

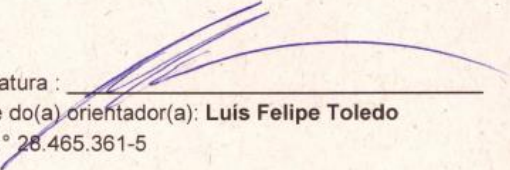
Data: 03 de setembro de 2018

Anexo V.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **O quitrídio nos ranários do estado de São Paulo e suas implicações para conservação da anurofauna nativa**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 31 de agosto de 2018

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Luísa de Pontes Ribeiro**
RG n.º 46.822.713-1

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Luís Felipe Toledo**
RG n.º 28.465.361-5