

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**INSTITUTO DE BIOLOGIA** 

**DIEGO DE MOURA CAMPOS** 

## **RISK OF CHYTRIDIOMYCOSIS IN DIRECT-DEVELOPING ANURANS**

## RISCO DE QUITRIDIOMICOSE EM ANFÍBIOS ANUROS DE DESENVOLVIMENTO DIRETO

CAMPINAS

2020

### **DIEGO DE MOURA CAMPOS**

## **RISK OF CHYTRIDIOMYCOSIS IN DIRECT-DEVELOPING ANURANS**

## RISCO DE QUITRIDIOMICOSE EM ANFÍBIOS ANUROS DE DESENVOLVIMENTO DIRETO

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

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

Orientador: Dr. Carlos Guilherme Becker

Coorientador: Dr. Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO DIEGO DE MOURA CAMPOS E ORIENTADA PELO DR. CARLOS GUILHERME BECKER.

### CAMPINAS

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

 Moura-Campos, Diego, 1994-Risk of chytridiomycosis in direct-developing anurans / Diego de Moura Campos. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.
 Orientador: Carlos Guilherme Becker. Coorientador: Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
 1. Batrachochytrium dendrobatidis. 2. Anfíbio - Desenvolvimento. 3. Anuro. 4. Seca. 5. Variação sazonal. I. Becker, Carlos Guilherme. II. Toledo, Luís Felipe, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Risco de quitridiomicose em anfíbios anuros de desenvolvimento direto

Palavras-chave em inglês: Batrachochytrium dendrobatidis Amphibians - Development Anura Drought Seasonal variation Área de concentração: Ecologia Titulação: Mestre em Ecologia Banca examinadora: Carlos Guilherme Becker [Orientador] David Rodriguez Alessandro Catenazzi Data de defesa: 11-08-2020 Programa de Pós-Graduação: Ecologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-9733-1257 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/5380007434831345

Campinas, 11 de Agosto de 2020

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a). Dr. CARLOS GUILHERME BECKER

Prof.(a). Dr. DAVID RODRIGUEZ

Prof.(a). Dr. ALESSANDRO CATENAZZI GIANNONI

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa em Ecologia do Instituto de Biologia.

À memória dos meus avós, Joaquim e Vitalina Moura, meus primeiros professores na matéria de amar a natureza.

À toda a população LGBT que continua diariamente lutando e provando seu valor.

À biodiversidade brasileira, na esperança que este trabalho seja útil como ferramenta para sua preservação.

### Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Dr. Gui Becker por todas as ideias, oportunidades, conselhos e ajuda durante todo meu mestrado, estando presente mesmo à distância.

Ao meu co-orientador Dr. Luís Felipe Toledo por toda infraestrutura fornecida e por ter me recebido em seu laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia da UNICAMP, em especial ao coordenador Dr. Martin Pareja por todo o auxílio e conselhos durante meu mestrado.

À Fundação Serra do Japi, Base Ecológica Municipal Serra do Japi e Fazenda Montanhas do Japi por todo apoio e infraestrutura durante coleta de campo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA) e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo oferecimento do curso de campo "Ecologia da Floresta Amazônica (EFA)". Agradeço a todos os coordenadores, professores e alunos que me proporcionaram uma experiência de aprendizado gigantesca.

À toda minha família que sempre me apoiou na minha jornada e batalhou muito para poder me dar a melhor formação possível. Em especial minhas três mães: Tide, Elizabete e Diva Moura e minha irmã Francine Moura. Esse trabalho é parte de vocês também.

Aos meus amigos de longa data: Cristian Hessel, Guilherme Senger, Victor Rabesquine, Bruna Ghirardi, Gleice Rodrigues, Debora Cavalcante, Danilo Zenovello e Carla Santucci pelo apoio emocional e risadas durante todo esse tempo, não teria conseguido sem vocês.

Aos amigos que compartilham o amor pela biologia: Anna Toselli, Livia Santiago, Melissa Botelho, Vanessa Goulart e Paula Nagumo por me acompanharem e dividirem tantos momentos incríveis comigo.

À minha família de Liverpool que mesmo à distância sempre me apoiou e acredita mais em mim do que eu mesmo: Júlia Schleder, Flavia Degani, Patrícia Gueratto, Raylane Castoldi, Guilherme Brito, Cristina Muller e Carolina Betker.

Um agradecimento especial aos novos amigos que conquistei nessa jornada, todos do LaHNAB tiveram um impacto muito grande em mim e mostraram que ciência não se faz sozinho, obrigado pelos conselhos, companheirismo e risadas. Em especial, Tamilie Carvalho, Luísa Ribeiro e Janaína Serrano, esse trabalho jamais teria acontecido sem a ajuda de vocês. Vocês me ensinaram muito sobre conhecimento científico, mas mais ainda sobre como ser uma pessoa melhor.

A Wesley Neely e Sasha Greenspan por todos os conselhos, risadas, paciência e ajuda durante minha estadia nos Estados Unidos e análise molecular.

A todos que me ajudaram durante a coleta de campo, em especial ao Victor Favaro que esteve presente em todas as campanhas, obrigado pelos ensinamentos e conversas.

À Mariana Lyra, Cinthia Brasileiro e Daniel Medina por correções e sugestões na primeira versão desta dissertação.

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

### **RESUMO**

Grande parte do declínio das populações de anfíbios no Brasil e em outros países tem base na disseminação do fungo quitrídio Batrachochytrium dendrobatidis (Bd). Como este fungo é um patógeno com ciclo de vida aquático, a maioria dos estudos sobre quitridiomicose foca em espécies de anfíbios com desenvolvimento larval em corpos d'água. Contudo, estudos recentes demonstram que anuros com desenvolvimento direto em ambientes terrestres carregam altas cargas de infecção e são altamente susceptíveis à quitridiomicose. Aqui testamos como fatores bióticos e abióticos impactam espaço-temporalmente a infeção por Bd e o risco de quitridiomicose em espécies de anfíbios anuros com desenvolvimento direto. Desenvolvemos o estudo na Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi, onde amostramos sazonalmente prevalência e carga de infecção do fungo, além de variáveis ambientais ecologicamente relevantes tanto aos hospedeiros quanto à persistência de Bd. Cruzamos dados atuais de precipitação com médias históricas de precipitação de forma a observar possíveis desvios no padrão esperado de chuvas. A carga de infecção média de Bd atingiu seu valor máximo durante a estação reprodutiva, enquanto prevalência foi crescente durante todo o período amostrado. Nossas análises mostraram uma relação entre déficit de chuvas durante o período reprodutivo e o aumento da carga de infecção e mortalidade em anfíbios de desenvolvimento direto. A proximidade de corpos d'água também se mostrou um fator relevante para o aumento médio nas cargas de infecção. Além disso, variáveis espaciais como umidade da serrapilheira e baixas altitudes influenciaram positivamente a prevalência do fungo. Nossos resultados indicam que eventos de variabilidade climática podem agir como fatores estressantes, possivelmente afetando a resposta imune dos anfíbios e, consequentemente, aumentando sua susceptibilidade às doenças. Variações em padrões climáticos também podem intensificar movimentação de anfíbios com desenvolvimento larval aquático que atuam na transmissão do Bd de corpos d'água para hospedeiros exclusivamente terrestres (respingos de infecção). A observação de indivíduos mortos apresentando cargas de infecção extremamente altas sugere debilidade associada à quitridiomicose; evidenciando que a doença ainda é uma ameaça a anfíbios, mesmo em área enzoótica. Atuais mudanças em ambientes naturais podem levar a um aumento na frequência de eventos climáticos extremos, expondo anfíbios com diferentes hábitos de vida a patógenos. Desta forma, esforços de conservação devem levar em consideração risco associado à doenças em espécies menos resistentes.

Palavras-chave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, Anura, desenvolvimento direto, seca, sazonalidade.

### ABSTRACT

The majority of the declines of amphibian populations in Brazil and other countries is based on the emergence of the chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis (Bd). This fungus is a waterborne pathogen, and therefore most studies on chytridiomycosis focus on amphibian species with aquatic larval development. However, recent studies have shown that frogs with direct development in terrestrial environments carry high infection loads and are highly susceptible to chytridiomycosis. Here we test how biotic and abiotic factors affect Bd infection spatially and temporally, and the risk of disease in anuran species with direct development. The study took place at Biological Reserve Serra do Japi, where we carried out seasonal sampling of Bd prevalence and infection load, in addition to ecologically relevant environmental variables for both hosts and Bd persistence. We also compared precipitation data in the area with historical averages in order to observe possible variations in the expected rainfall pattern. Average Bd infection load reached its maximum value during the rainy season, while prevalence increased throughout the sampling period. Our analyses showed a relationship between rainfall deficit during the reproductive season and Bd infection loads/mortality event in anurans with direct development. The proximity of water bodies also showed a positive effect on the average infection load. In addition, spatial variables such as leaf litter moisture and lower altitudes positively influenced prevalence of the chytrid fungus. Our results show that events of climatic variability may act as stressors, possibly affecting the immune response of amphibians and, consequently, increasing their susceptibility to diseases. Variations in climatic patterns can also intensify movement of aquatic-breeding species that act as Bd carriers from water bodies to terrestrial species (spillover). Dead individuals with extremely high infection loads, suggest death linked to chytridiomycosis; showing that the disease is still a threat to amphibians in enzootic areas. Current changes in natural environments can lead to an increase in the frequency of extreme climatic events, exposing amphibians with diverse life cycles. Therefore, conservation efforts must take into account disease risk in less resistant species.

**Key-words:** *Batrachochytrium dendrobatidis*, Anura, direct development, drought, seasonality.

# SUMÁRIO

GENERAL INTRODUCTION	[	11
ARTICLE		14
Abstract		15
Introduction		16
Methods		18
Results	••••••	22
Discussion		24
Acknowledgements		29
FINAL CONSIDERATIONS		40
REFERENCES		41

### **GENERAL INTRODUCTION**

Amphibians have been suffering from discontinuity between terrestrial and aquatic habitats (Becker et al. 2007) and chytridiomycosis outbreaks; a disease caused by the aquatic fungus Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) (Skerratt et al. 2007). Hundreds of amphibian species that show true terrestrial reproduction (direct development) are also in high threat categories according to the IUCN, suffering mainly from the loss of natural vegetation, combined with the narrow geographical distribution of species in this group (IUCN 2017). Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) is a generalist fungal pathogen on amphibians that infects larval and adult frogs with different reproductive modes (Lips et al. 2003) and is considered to be the main factor in the decline of amphibians globally (Berger et al. 1998, Skerratt et al. 2007, Carvalho et al. 2017, Scheele et al. 2019). Bd presents a flagellate free life phase, called zoospore, which spreads through water bodies where it may come in contact with animals; after contact, the fungus takes on a sessile form of zoosporangium where it reproduces asexually (Berger et al. 1998). The infection occurs in keratinized regions of the epidermis of adult amphibians and the oral apparatus in tadpoles, causing changes in gas exchange, ionic imbalance, hyper keratinization and, in the case of tadpoles, reduced feeding capacity (Voyles et al., 2007). Consequently, these changes tend to decrease fitness and may lead to host mortality (Burrowes et al. 2008, Garner et al. 2009, Venesky et al. 2009, Bovo et al. 2016).

Chytridiomycosis is associated with large-scale amphibian declines in Brazil occurred mostly during the 1970s and 1980s in the Brazilian Atlantic Forest (Carvalho et al. 2017). During this period, rapid and significant reductions in anuran populations were concentrated along montains in the states of São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro (Heyer et al. 2013) and Espírito Santo (Weygoldt 1989). At least thirteen species of anurans were affected only in the Boracéia biological station (SP), in addition to those that were not sampled. Through a retrospective epidemiology study using specimens deposited in museums, Carvalho et al. (2017) found a spatial-temporal correlation between an increase in Bd infection rates and the historical declines of amphibian populations across the Atlantic Forest. Currently, the fungus has an enzootic distribution throughout the country, with low prevalences in the Cerrado, Caatinga, and the Amazon, whereas many amphibian populations have been reported to carry high infection prevalence in areas of the South and Southeast Atlantic Forest (Rodriguez et al. 2014, Valencia-Aguilar et al. 2015, Becker et al. 2016a, Carvalho et al. 2017, Benício et al.

2019). Due to the high diversity of amphibians with different life histories and also both high prevalence and genotypic diversity of the Bd fungus (Jenkinson et al. 2016), Brazil's Atlantic Forest is a key biodiversity hotspot in the study of chytridiomycosis.

Amphibians that reproduce in water bodies are naturally more exposed to the fungus in the environment because the pathogen has a flagelated/aquatic life cycle. Yet, directdevelopping species (*i.e.* species that during their life history do not present an aquatic larval phase), are also exposed to the fungus through sporadic contacts with water bodies (natural reservoirs of the fungus) or through direct transmission between individuals (Longo and Burrowes 2010). The few studies focusing on direct-developing anurans report low Bd prevalence in Brazil (Mesquita et al. 2017, Ruggeri et al. 2018), however the few infected frogs carry exceptionally high Bd zoospore loads (Gründler et al. 2012, Greenspan et al. 2018). In a controlled laboratory study, Mesquita et al. (2017) recently showed that, when experimentally exposed to the fungus, amphibians with direct development presented much higher zoospore loads and mortality rates when compared to amphibians with aquatic development. High mortality rates among amphibians with direct development may be linked to low prevalence in the wild, since infected individuals are possibly removed from the population due to lethal chytridiomycosis (Preuss et al. 2016). The differences in survival between amphibians with distinct life histories are probably associated with reduced adaptive responses against the pathogen among direct-developping frogs, since in their ontogeny, exposure to the fungus in aquatic reservoirs is not recurrent.

Direct-developing amphibians are commonly threatened with extinction due to their high dependency on pristine terrestrial environments (mostly rainforests) and restricted geographical distributions (IUCN 2017), consequently they are also exposed to a lower diversity of parasites, which makes them more susceptible to emerging or resurgent generalist pathogens (Gervasi et al. 2017). Therefore, the combination of low resistance and tolerance can make them vulnerable to environmental changes that directly or indirectly affect the risk of exposure to the fungus. An alarming example is that disappearance of *Holoaden bradei*, a direct-developping species possibly extinct in the Atlantic Forest due to chytridiomycosis, as an increase in Bd infection rates in the Serra da Mantiqueira coincided with the disappearance of this endemic amphibian species (Carvalho et al. 2017). In this case, one of the hypotheses is that climatic or seasonal fluctuations may have facilitated the exposure of different amphibian populations to Bd in the wild (Carvalho et al. 2017). Factors such as prolonged drought can aggravate disease risk mainly because animals with different habits and levels of Bd

susceptibility concentrate around humid refugia during these dryer-than expected periods (Adams et al. 2017). It is noteworthy that certain abiotic conditions directly influence the spread of the fungus (Lips et al., 2003), however most studies address the low tolerance of Bd to temperatures above 25° C for optimal growth (Longcore et al. 1999, Whitfield et al. 2012, Voyles et al. 2017). Still, variables that can alter the local microclimate, such as vegetation density and litter density, must be taken into consideration (Becker et al., 2012). Conditions that affect the distribution, density and diversity of host amphibians also contribute to transmission in species with direct development (Becker et al. 2014, Kolby et al. 2015). The microbiome of each individual can also make a significant contribution to the disease, as recent studies point to the inhibitory effects of various bacteria on Bd growth (Bletz et al. 2013, Woodhams et al. 2015, Piovia-Scott et al. 2017). Accelerated climate change highlights the urgent need to understand host-pathogen interactions in amphibians with direct development in the wild through a spatiotemporal framework. This study aims to understand the effect of climate and microclimate variability on the risk of Bd infection and the fitness of a highly threatened and biodiverse group of tropical amphibians.

### ARTICLE

## Seasonal disease dynamics in direct-developing anurans linked to rainfall deficit and micro-environmental conditions

Diego Moura-Campos<sup>1</sup>, Sasha E. Greenspan<sup>2</sup>,

Wesley J. Neely<sup>2</sup>, Luís Felipe Toledo<sup>1</sup>, C. Guilherme Becker<sup>2</sup>

### Authors' affiliations:

<sup>1</sup> Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-862, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, The University of Alabama, Tuscaloosa AL 35487, USA.

### Abstract

Climate change has been fueling disease outbreaks globally. One important climate-driven pathogen is the chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis (Bd). Bd is associated with amphibian population crashes across several regions, with particularly devastating population declines in the Neotropics. Despite being a waterborne pathogen, recent studies have shown that direct developing anurans (i.e., species without tadpoles) are both less resistant and less tolerant to the fungus than aquatic breeding species (i.e., species with tadpoles). Here, we conducted a fine-scale sampling of Bd prevalence and infection load in direct-developing anurans throughout a landscape of Brazil's Atlantic Forest to understand how disease dynamics respond to environmental forces throughout multiple seasons. We obtained environmental data including rainfall, temperature, proximity to streams, elevation and leaf litter moisture. We crossed monthly precipitation data during the sampling period with historical precipitation data (last six decades) to generate a temporal metric of rainfall deviation. We found higher Bd infection loads during the breeding (rainy) season. Conversely, Bd prevalence increased throughout the sampling period, peaking at 31 % during the last field campaign. During the breeding season, we recorded a local die-off of the pumpkin toadlet (Brachycephalus sp.), the most abundant of the focal species. These individuals showed average Bd infection loads three orders of magnitude higher than other Bd positive individuals of the same species, indicating a link between Bd infection and the observed die-off. Rainfall deficit predicted both Bd infection loads and individual apparent survival probability in our generalized linear mixed models. However, a one-month rainfall deficit lagged effect predicted higher Bd infection loads, whereas a two-month rainfall deficit lagged effect predicted higher individual apparent survival probability. These lagged effects could be due to stressing factors during dry periods affecting animal immune response to the fungus; where the fungus progressively develops on amphibian skin, occasionally leading to death after two months. Variations in climatic patterns can also intensify motility of aquatic species that act as Bd carriers from water bodies to exclusive terrestrial species (*i.e.*, pathogen spillover). Proximity to water bodies also positively influenced Bd infection load, while leaf litter moisture positively influenced Bd prevalence. Our results indicate that rainfall deficit and micro-environmental conditions influence disease dynamics of direct developing anurans. Our data provide important information about host-pathogen dynamics and disease risk in a biodiverse and highly threatened vertebrate group in light of climate change.

### Introduction

A growing number of wildlife and human diseases have been linked to anthropogenic climate change (Epstein 2001, Reither 2001). Most of these studies focus on effects of temperature on disease emergence and transmission (Altizer et al. 2006, Elderd and Reilly 2014), but shifts in rainfall regimes may also trigger outbreaks (Ari et al. 2011, Morand et al. 2013). Shifts in rainfall and hydrology should influence animal habitat selection (vertebrates and invertebrates) with downstream impacts on direct transmission and encounters with environmental disease reservoirs (Burrowes et al. 2004). In addition, suboptimal environmental conditions may lower host immune capacity. Drying trends in moist tropical forests are expected to intensify within the next decades (Dai 2013, Fu et al. 2013, Jiang et al. 2019), with predicted negative outcomes for a large fraction of global biodiversity (Archaux and Wolters 2006, Clark et al. 2016). However, it still remains unclear how shifts in rainfall regimes will affect disease dynamics in animals with different life histories.

*Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) is a waterborne pathogen and thus rainfall variability and extreme climatic events such as droughts and floods are expected to affect disease dynamics in tropical amphibians (Li et al. 2013, Walls et al. 2013, Ruggeri et al. 2018). The majority of frog population declines across the global tropics have been linked to the emergence of this chytrid fungus (Scheele et al. 2019). For example, El Niño years have triggered Bd outbreaks in Neotropical harlequin frogs (Rohr and Raffel 2010), even after accounting for the lack of spatiotemporal independence among sampling events (Rohr et al. 2008). If we consider the impacts of climate change on the host, then it is expected that increased climate variability will negatively affect host immune capacity against Bd (Raffel et al. 2015, Greenspan et al. 2017). Therefore, deviations from historical rainfall and temperature averages (*i.e.*, climate anomalies) should reduce host tolerance to infections possibly triggering new chytridiomycosis outbreaks in amphibians.

Most reported amphibian declines attributed to Bd have involved aquatic-breeding amphibian species (Scheele et al. 2019). However, terrestrial-breeding frog species with direct-development have been experiencing cryptic Bd-linked population declines and extinctions (Burrowes et al. 2004, Longo et al. 2013, Hirschfeld et al. 2016, Carvalho et al. 2017, Catenazzi et al. 2017) possibly attributed to droughts (Longo et al. 2010) and increased spatial aggregation and/or pathogen spillover in humid refugia (Burrowes et al. 2004, Jones et al. 2008, Becker et al. 2019). Terrestrial-breeding frogs respond behaviorally to subtle shifts in precipitation, even

just a few consecutive days without rain (Stewart 1995). Direct-developing species complete their life-cycle in the forest leaf litter and thus do not require access to water bodies to complete their ontogenetic development (Wells 2010), which often translates to low Bd prevalence in wild populations (Ruggeri et al. 2018). This lack of regular contact with Bd in water bodies may preclude direct developing amphibians from developing immune responses against waterborne chytrids through the life cycle of individuals to evolutionary time scales (from individual to population levels). In agreement with this prediction, direct-developing amphibian species from Brazil experienced higher mortality rates than aquatic-breeding species when experimentally exposed to Bd (Mesquita et al. 2017, Neely et al. 2020). These recent findings indicate that shifts in rainfall could negatively affect populations of direct developing amphibians.

Here we tested for spatiotemporal drivers of Bd infection in direct developing species, including rainfall, moisture, temperature, elevation, and microhabitat structure. We recorded Bd prevalence and infection load in two genera of direct-developing species over a full annual cycle in an upland area of Brazil's Atlantic Forest. Given the temperature and moisture sensitivity of Bd, and growing evidence that Bd spillover from aquatic-breeding frogs may drive Bd dynamics in direct-developing species, we predicted an upsurge in Bd infection prevalence and loads during the thermally mild, rainy (breeding) season, when frogs are most active. Since Bd is a waterborne pathogen, we also expect a significant clustering of Bd-positive (Bd<sup>+</sup>) individuals near water bodies. Our surveys aligned with a summer drought, allowing for a particularly in-depth analysis of the possible links between rainfall anomalies and Bd infection dynamics in our focal direct-developing species. Combined, our results shed light on the emerging disease dynamics of enzootic host-generalist pathogens under projected climate change.

### Methods

### Study site and species

We conducted our study at the Reserva Biológica Municipal Serra do Japi, a 20,712-km<sup>2</sup> municipal biological reserve in the Atlantic Forest of the state of São Paulo, Brazil (-23.23°S, - 46.96°W, 600-1200 m a.s.l.). Due to its relatively high elevation, it is one of the largest remaining continuous forest in the state of São Paulo. The site has been a protected park since 1983, following a long history of coffee cultivation (Morelatto 1992), but is now composed of a matrix of primary and secondary forests. Serra do Japi is a semi-deciduous tropical forest with well-defined seasonality: a cool, dry period (April to September) with an average temperature of 17 °C and average rainfall of 72 mm/month and a warm, wet period (October to March) with an average temperature of 21 °C and average rainfall of 194 mm/month (Leitão-Filho 1992). During the 1-year sampling period, average daily microclimate temperature varied from 14 °C during winter to 21 °C during the summer (Figure 1A). The maximum temperature recorded was 36 °C during summer and the minimum temperature was 5 °C during winter. Rainfall during the sampling period generally followed historical trends except for December, when the recorded rainfall fell to less than half of the last six decades monthly average (59-year mean = 209 mm; 2018 mean = 101 mm; Fig. 1B) (Abatzoglou et al. 2018).

The five species of direct-developing frogs (Brachycephaloidea) that occur at Serra do Japi are the pumpkin toadlet *Brachycephalus* sp. (Brachycephalidae; aff. *ephippium*), three species in the genus *Ischnocnema* (Brachycephalidae; *I. cf. guentheri*, *I. cf. parva*, and *I. juipoca*), and *Haddadus binotatus* (Craugastoridae), the least abundant of the five species (Ribeiro et al. 2005, Rocha et al. 2007). All of these species inhabit the forest leaf litter. *Brachycephalus* sp. is aposematic and diurnal (Rebouças et al. 2019). The genus *Ischnocnema* is composed of cryptic species that share similar crepuscular-nocturnal habits, reproductive season and environmental preferences (Ribeiro et al., 2005).

### <u>Study design</u>

We established 25 sampling plots spaced at least 100 m apart in primary and mature secondary forest. Each plot was a circular area of 15-m diameter totaling 700 m<sup>2</sup>. Twelve plots were adjacent to water bodies (first or second order streams) and 13 plots were at least 70 m away from water bodies. We surveyed all plots approximately every 2 months from May 2018 to

May 2019, totaling six 10-day field campaigns. Our sampling began in the cool/dry season and extended through a warm/wet season and into the beginning of the next cool/dry season. We also selected 10 of the plots with variable vegetation cover and high frog density (five plots adjacent to water bodies and five distant from water bodies) to survey on three consecutive days within field campaigns two through six. Sampling on consecutive days was required for future studies on host survival probability using Bayesian modeling and also increased sample size on the current analysis.

### Sampling protocol

To sample each plot, two observers searched for direct-developing frogs in the forest litter for one hour or until seven frogs were captured. Our search included turning the leaf litter over in order to find hidden animals. We placed each frog in a sterile plastic bag until processing for no more than two hours. We rinsed each frog with 15 mL of distilled water to remove debris then swabbed the skin following protocols described by Hyatt et al. (2007). We released all frogs at the point of capture. Swabs were stored on ice and transferred to a -20 °C freezer within 4 h. We followed the same swabbing protocol for frogs that were found dead in the forest leaf litter. We calculated capture rate in each plot by dividing the number of animals captured by the survey duration (number of frogs/survey duration in minutes).

### Abiotic predictors of disease

We used HOBO data loggers deployed at the center of each sampling plot to record the temperature of the leaf litter environment every 6 h during the entire duration of the study. We placed each data logger at least 10 cm below the litter surface in order to avoid direct sunlight. We used the logged temperatures to calculate average daily and monthly temperatures for each plot. We calculated deviation from historical average monthly temperatures during the course of the study based on local historical averages of the last six decades (Abatzoglou et al. 2018). During the last field campaign (May 2019), we measured leaf litter depth at 10 haphazardly selected points in each plot using a ruler. To estimate variation in litter moisture among sampling sites, we collected approximately 1 L of leaf litter at the center of each plot during the last sampling campaign. We, then, recorded leaf litter mass before and after drying in a drying oven and subtracted the dry mass from the original mass. Measurements of leaf litter moisture

and depth during the last field sampling allowed for a comparison of variation among sampling plots. We gathered daily rainfall records collected from a rain gauge located 3 km from the center of the study area (CIIAGRO - Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas, 2019), and calculated accumulated monthly rainfall. We calculated deviation from historical monthly rainfall during the course of the study based on local historical averages (Abatzoglou et al. 2018). Because Bd typically exhibits an incubation period of a few weeks to a few months (Berger et al. 2005), which also applies to infection in direct-developing species (Mesquita et al. 2017, Greenspan et al. 2018, Ribeiro et al. 2019), we also calculated two lagged rainfall deviation metrics for each sampling day based on total rainfall deviation in the preceding one month (1-month lagged rainfall deviation) and two months (2-month lagged rainfall deviation). Specifically, for each month, we subtracted the historical average accumulated rainfall from the accumulated rainfall of the sampled month. Thus, negative values indicate dryer-than-average months while positive values indicate wetter-than-average months. We obtained elevation data for each sampling site based on geolocation using a Garmin 62s GPS unit.

### Pathogen quantification

To extract DNA from skin swabs, we used the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol with minor modifications including increasing the incubation time during the cell lysis stage to overnight. To quantify Bd infection load, we used Taqman quantitative PCR assays following Boyle et al. (2004) with synthetic standards ranging from 10<sup>6</sup> to 10<sup>2</sup> gene copies (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA). Our metric of Bd infection load is thus based on number of ITS copies rather than number of zoospore genomic equivalents. We ran plates in duplicate, with mismatching samples run on a triplicate plate, and only samples showing positive on 2 plates were recorded as positive. Bd loads were averaged across the duplicate plates.

### Statistical analyses and modeling

### Generalized linear mixed models

We analyzed temporal Bd infection data for two highly abundant genera of direct developing frogs: 523 pumpkin toadlets (*Brachycephalus* sp.) and 225 frogs of the genus *Ischnocnema* (147 *I. cf. guentheri*, 59 *I. cf. parva* and 19 *I. juipoca*). We grouped all three species of *Ischnocnema* 

for analyses because these species exhibit similar environmental preferences relevant to disease dynamics. Frogs in the genus *Haddadus* were excluded from our analyses because they were spatially clustered, encountered infrequently throughout our sampling (41 captures), and were rarely infected with Bd (n = 2). We determined temporal patterns of Bd prevalence and infection loads for *Brachycephalus* and *Ischnocnema* using binomial and Gaussian models, respectively.

We used Generalized Linear Mixed Models (GLMM) with sampling site included as a random effect and accounting for temporal (Julian date) autocorrelation AR1 (package and function glmmTMB in Program R) (Brooks et al. 2017, R Core Team 2018). Specifically, we used binomial GLMMs (logit link) to test for the effects of environmental variables on Bd prevalence and used Gaussian GLMMs (log link) to test for the effects of environmental variables on Bd infection loads (log<sub>10</sub>-transformed ITS copy number; Bd<sup>+</sup> individuals only). We included the following explanatory variables in the analyses and trimmed the full model for both prevalence and infection loads using a backwards stepwise procedure based on AICc: elevation, proximity to closest water body (adjacent *vs.* away), accumulated rainfall during each sampling month, rainfall and temperature deviation during sampling months (including 1-month lagged deviations), monthly mean leaf litter temperature, leaf litter moisture, leaf litter depth, capture rate, and genus.

We compared average infection loads of dead *vs*. live Bd<sup>+</sup> individuals of *Brachycephalus* sp. using a non-parametric Wilcoxon test. Lastly, we tested for the independent effects of Bd infection loads and rainfall deviation (including both 1-month and 2-month lagged effects) on the proportion of dead *Brachycephalus* sp. during the course of field sampling while accounting for temporal autocorrelation (AR1) and sampling site (random effect) using a GLMM and binomial family.

### Results

### <u>Bd prevalence</u>

In both *Brachycephalus* and *Ischnocnema* spp., *Bd* prevalence varied throughout the sampling period (Figure 2A, B). Prevalence was consistently low through the cool/dry season, gradually increased through the warm/wet season, and peaked at 27 % (*Brachycephalus* sp.) and 41% (*Ischnocnema* spp.) at the beginning of the next cool/dry season. The most parsimonious GLMM explaining Bd prevalence included a positive effect of leaf litter moisture, a negative effect of elevation, and a significant effect of genus: *Ischnocnema* spp. presented higher overall Bd prevalence (Table 1).

### **Bd** infection loads

Infection loads in sampled individuals ranged from 0.4 to over 800,000,000 ITS copies. During the cool/dry season (June–October), average infection loads decreased in *Brachycephalus* sp. (Figure 2C), while this trend was less pronounced for *Ischnocnema* spp. (Figure 2D). Average infection loads in both genera increased sharply during the warm/wet season (October–December) and decreased to the lowest recorded loads at the beginning of the next cool/dry season (May; Figure 2C, D). The best predictors of Bd infection load were rainfall deviation (1-month lagged effect) and proximity to streams (Table 1). Larger deficits in rainfall during the month preceding sampling predicted higher Bd infection loads in Bd<sup>+</sup> individuals (Figure 3A). Average Bd infection loads were also higher among individuals captured adjacent to streams (Average = 31,889,175; SD = 179,027,932 ITS copies) than among individuals captured away from streams (Average = 322,668.2; SD = 1,590,603.3; Figure 3B). Genus was not a significant predictor of Bd infection loads, but when included in the best model, the effects of rainfall deviation (deficit) and proximity to streams remained statistically significant.

### **Bd-induced mortality in Brachycephalus sp.**

We recorded nine dead or dying individuals of *Brachycephalus* sp. during our sampling period (Figure 6). Bd infection load was a strong positive predictor of mortality ( $\beta$ =0.977, Z=2.755, P=0.006; Figure 4), and the average Bd infection load of dead individuals (n=9; 1,145,512±16SD ITS copies) was three orders of magnitude higher than the average infection load of live, Bd<sup>+</sup> individuals (n = 71; 2,050 ± 80 SD ITS copies) (Z = 3.745, P < 0.001).

Mortality was concentrated in four days during the fifth sampling campaign (February 2019) and rainfall deviation (2 months lag) was a predictor of mortality ( $\beta = 0.015$ , Z = 1.909, P = 0.056; Figure 5A-B); rainfall deviation (1-month lag) was not a predictor of survival (P = 0.458). We found no support for shifts in frog capture rate adjacent *vs.* away from streams during the course of our sampling (Table S1; Figure S1).

### Discussion

Our findings highlight that direct-developing species could be particularly vulnerable to synergistic interactions between Bd and climatic anomalies. Specifically, we tested a suite of spatial and temporal variables as predictors of Bd infection dynamics in two genera of direct-developing frogs in an upland area of Brazil's Atlantic rainforest and found that both *Bd* infection intensity and mortality were correlated with rainfall deficit. This finding is consistent with previous studies of direct-developing *Eleutherodactylus* species in Puerto Rico, the only group of direct-developing frogs for which long-term data on population and Bd infection dynamics has been recorded (Burrowes et al. 2004). These results, combined, raise the possibility that the synergistic interaction between drought and Bd infection may be a dominant driver of the cryptic population crashes among direct-developing frogs that have occurred across disparate geographic areas (Burrowes et al. 2004, Longo et al. 2013, Hirschfeld et al. 2016, Carvalho et al. 2017). We suggest that anthropogenic climate change may accelerate declines of a Bd-susceptible and biodiverse amphibian clade: the Brachycephaloidea which contains over 1,100 described species (Frost 2020).

Our focal direct-developing species were more likely to be infected with Bd at higher levels of leaf litter moisture. Due to their terrestrial life-cycles, direct-developing species are infrequently in contact with permanent water bodies; thus, Bd exposure depends on transmission from moist leaf litter or direct contact with infected individuals (Longo et al. 2010, Kolby et al. 2015). Since Bd is a waterborne pathogen, leaf litter moisture also favors its maintenance in the microenvironment (Longo et al. 2010). Direct developers are likely to be more active under moist conditions when desiccation risk is relatively low. Co-occurring aquatic-breeding frogs are also more likely to forage and migrate under moist microclimatic conditions. This increased level of activity under moist conditions may increase the probability of direct developers coming into contact with zoospores recently shed by other frogs in the environment.

Direct-developing frogs were also more likely to be infected with Bd at lower elevations. Our study landscape of Serra do Japi is a relatively high elevation area (738–1018 m), where average daily litter temperatures (14–21 °C) consistently varied within the optimal growth range for Bd (Piotrowski et al. 2004, Stevenson et al. 2013, Voyles et al. 2017, Muletz-Wolz et al. 2019), which could explain why micro-environmental temperature was not a strong correlate of disease. While Bd infection is typically positively associated with elevation, a

pattern usually driven by temperature differences between warm lowlands and cool uplands, our study sites spanned a relatively narrow elevation gradient. Thus, the effects of elevation in our study were probably not driven by temperature. An alternative explanation is that drift of zoospores downstream created larger zoospore source pools at our lower elevation sites compared to our high elevation sites (Sapsford et al. 2013). Another possibility is that the thermal optima of our focal direct-developing species are relatively low and that temperatures at our lower elevation sites vary farther outside this optimum range compared to temperatures at our higher elevation sites, which could give the pathogen a competitive edge at warmer lower elevations (Cohen et al. 2017, Neely et al. 2020). In addition, plant communities at Serra do Japi shift dramatically above 870 m in response to the geological structure of the mountains (Rodrigues et al. 1989, Leitão-Filho 1992). Shifts in vegetation also correlate with changes in the amphibian community composition. Thus, another possible explanation for lower Bd prevalence at higher elevations is that parallel shifts in amphibian community composition could change spillover infection dynamics along the elevation gradient.

We found that Bd loads among direct-developing frogs were higher in frogs sampled adjacent to streams. Our focal species carried the highest Bd loads during the wet summer season, a period when aquatic-breeding species congregate around streams for reproduction. Because Bd is a generalist pathogen, broadly infecting both terrestrial and aquatic species (Valencia-Aguilar et al. 2015, Becker et al. 2016b), these aquatic-breeding species are likely to be infected with Bd, with breeding aggregations forming a large source pool for infective zoospores (Longo et al. 2010, Becker et al. 2016b). In addition, recently metamorphosed frogs may also carry high Bd prevalence and may frequently shed zoospores in terrestrial habitats when dispersing (Kolby et al. 2015). Thus, the high infection levels observed in the focal terrestrial frogs near streams could have been driven by seasonal pathogen amplification through spillover from nearby aquatic-breeding frogs. This is consistent with the finding that terrestrial-breeding Brachycephalus pitanga acquired lethal Bd infections from neighboring aquatic-breeding species with mild Bd infections (Becker et al. 2019). While it is reasonable to predict that both Bd infection loads and prevalence would be higher near streams (see Figure 3B) as a result of pathogen spillover, distance to stream was not a predictor of Bd prevalence in our study. Previous surveys during rainy seasons have frequently documented relatively low Bd prevalence among direct-developing frogs when infection loads were relatively high (Gründler et al. 2012, Ruggeri et al. 2018). This pattern could arise if a proportion of diseased frogs spend more time in hidden refugia and less time foraging, making them more difficult to detect through visual surveys. Alternatively, we would also observe this pattern if infection is extreme, where most exposed individuals die quickly from chytridiomycosis.

Direct-developing frogs were also more likely to carry heavy Bd loads when rainfall in the previous month fell below historical averages. Direct-developing frogs are sensitive to changes in rainfall and humidity because they largely depend on leaf litter moisture (as opposed to permanent water bodies) for hydration (Wells 2010). Thus, dry periods may rapidly impose physiological stress directly or indirectly through changes in behavior, such as reduced foraging to conserve moisture. These stressors may also weaken immune responses of direct-developing frogs, increasing the likelihood that Bd will become established after initial infection and promoting high rates of infection buildup (Kiesecker 2011, Rollins-Smith 2017). Moreover, Bd infection may exacerbate water stress by interfering with water absorption through the skin, potentially setting off a positive feedback loop of Bd infection and dehydration stress that further destabilizes the immune system (Voyles et al. 2012).

Infection loads in direct developers could also increase in response to drought if frogs move to moist refugia to avoid desiccation. This could increase frog density in retreat sites and subsequently trigger Bd outbreaks through increased rates of direct pathogen transmission (Longo et al. 2010, Adams et al. 2017). We tested for changes in capture rate, a proxy for frog density, during the drought period at our stream-adjacent sites, which are expected to contain the highest density of moist retreat sites, but this model showed little support for links between drought, altered host spatial distribution, and infection loads. One caveat of this finding is that our survey methods may have limited our ability to detect frogs grouped in moist retreat sites. On the other hand, direct-developing species are likely non-migratory and usually move relatively small distances over the course of their life cycle (Guilherme Becker et al. 2019) . Thus, they may lack traits needed to locate and move to humid retreat sites that are distributed at spatial scales larger than their home ranges, especially when they are suffering from dehydration stress. Instead, they may be adapted to remain relatively stationary even when environmental conditions within the home range become temporarily suboptimal, leaving them particularly vulnerable to other threats including disease.

We suggest that direct-developing frogs were able to manage the immediate fitness costs of drought stress when precipitation dipped below historical levels. However, it appears that this stress ultimately triggered increased buildup of Bd infections over the course of several weeks, to an extent that caused mortality two months after the spike in infection loads, consistent with the typical incubation period for Bd in *Brachycephalus* and *Ischnocnema* spp. (Mesquita et al. 2017, Greenspan et al. 2018, Ribeiro et al. 2019). Our results align with the previous finding that disappearances of several Puerto Rican direct-developing species in the genus *Eleutherodactylus* were attributable to the combination of Bd infection and extended dry seasons in the 1970s and 1990s (Burrowes et al. 2004).

Infection loads among dead individuals of *Brachycephalus* sp. were three orders of magnitude higher than among live Bd<sup>+</sup> individuals. In addition, two dead individuals presented signs of chytridiomycosis including heavily sloughing skin, redness and anorexia. These findings, combined with recent experimental work focusing on Bd infection dynamics in *Brachycephalus pitanga* (Becker et al. 2019), strongly suggests that the mortality we observed in our study was driven by a local chytridiomycosis outbreak (Van Rooij et al. 2015). Recording Bd-induced amphibian die-offs in real time is extremely rare because mortality usually follows soon after disease signs are exhibited and dead frogs decompose or are consumed quickly. While we only directly observed mortality of *Brachycephalus*, a visually conspicuous bright orange species, *Ischnocnema* species are well camouflaged, which would dramatically reduce the likelihood of finding dead individuals in the wild. Thus, it is likely that the low number of dead individuals that we recorded represents a small fraction of the actual number of animals affected by the disease.

During the last sampling campaign, we detected the highest Bd prevalence in combination with the lowest average infection loads, indicating widespread infection at the population level but low individual-level disease burdens. This pattern could arise if animals are able to survive initial infection followed by the development of acquired resistance to Bd over time. Alternatively, Bd could function as a selective pressure on populations of direct-developing frogs if the most highly infected animals die, eventually producing populations with higher proportions of resistance traits. The high mortality rates of direct-developing frogs in laboratory Bd challenge experiments supports the latter hypothesis, but further research is needed to fully understand the selective forces shaping resistance to Bd among wild populations of direct-developing frogs (Mesquita et al. 2017, Greenspan et al. 2018, Ribeiro et al. 2019).

Anthropogenic pressures across the planet are undeniably altering Earth's climate (Fauchereau et al. 2003, Narisma et al. 2007, Loo et al. 2015). In Brazil, rapid deforestation in the Amazon rainforest is directly modifying rainfall patterns, including in the Atlantic Forest region (Arraut et al. 2012, Boers et al. 2017, Leite-Filho et al. 2019). Retrospective studies have linked several historical amphibian declines in the Atlantic forest to Bd, seven of which were

recorded in Brachycephalus and Ischnocnema populations (Carvalho et al. 2017). Alarmingly, the direct-developing Atlantic forest species Holoaden bradei was last seen in the wild in the late 1970s, coincident with a Bd upsurge in aquatic breeders (Carvalho et al. 2017) in the same mountain corridor during a period of global climatic variability (Malhi and Wright 2004, Pounds et al. 2006). While there has been little direct evidence for ongoing declines in the region, our study includes the first record of clinical chytridiomycosis in a natural environment in Brazil and raises the possibility that certain environmental conditions may continue to shift Bd dynamics in the Atlantic forest from enzootic to epizootic, despite the relatively long history of host-pathogen coevolution in this region (Rodriguez et al. 2014, Carvalho et al. 2017, Byrne et al. 2019). Our results suggest that direct developing frogs may routinely face relatively nonthreatening spikes in pathogen pressure in response to seasonal shifts in leaf litter moisture and pathogen spillover associated with the movement ecology of more vagile, co-occurring species. However, our findings also suggest a scenario in which drought, or other climatic anomalies, may intensify seasonal infection spikes, to an extent that may trigger epizootic Bd outbreaks. Susceptible animals such as direct-developing species may be on the front line of outbreaks, since they experience more intense disease burdens than other species.

The combination of year-round Bd pressure and low resistance to the fungus (Mesquita et al. 2017) suggests that climatic conditions in this high-elevation area may be hovering just below a tipping point for Bd outbreaks among direct-developing frogs. Specifically, the genus *Brachycephalus* comprises at least six species putatively critically endangered and more than 10 species listed as data deficient in conservation status assessment (Bornschein et al. 2019). In particular, one population of *Brachycephalus* sp. (the same species as in the present study; (Condez et al. 2020)) has not been observed in Pico das Cabras, a pristine mountaintop in the Atlantic rainforest (42 km away from Serra do Japi), since 1995 despite continuous surveillance in the area (LFT, unpublished data). We reinforce the need to further study disease dynamics of tropical terrestrial-breeding amphibian species, including their role in community-level disease dynamics and the impact of climatic variability on the persistence on this neglected and hyperdiverse amphibian group.

### Acknowledgments

We thank Victor Favaro, Janaína Serrano, Tamilie Carvalho, Carolina Lambertini, Raoni Rebouças, Daniel Medina, Raquel Salla, André Oliveira, Ronaldo Santos, Fabio Kishimoto, Natalia Vieira, Guilherme Senger, Jung Hee Lamberti, Danilo Zenovello, Thaís Rodrigues, Ronildo Benício, Bruna Bombarda, Carolina Farhat, Cláudia Chen, Arthur Cavalcante, Maria Julia Viotti, Jéssica Maria Ferreira, Ana Claudia Callix, Camila Marques, Guilherme Alves, Simone Dena, Mariana Pontes and Luisa Ribeiro for assistance during fieldwork sampling. We thank Daniel Medina and Vanessa Marshall for assistance during laboratory procedures. We thank Fundação Serra do Japi and Fazenda Montanhas do Japi for infrastructure and logistic support during fieldwork. DMC thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 for stipend funding. LFT thanks São Paulo Research Foundation (FAPESP #2016/25358-3) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq #300896/2016-6) for a grant and a fellowship. Research permits were provided by SISBIO (61220-2, 27745-17), Universidade Estadual de Campinas Institutional Animal Care Committee (CEUA 4744-1/2017, 5440-1/2019), and Fundação Serra do Japi.

Predictors	Estimate	Std. Error	Ζ	р
Prevalence				
(Intercept)	8.432	2.965	2.844	0.004
Genus (Ischnocnema)	0.705	0.312	2.259	0.024
Elevation	-0.014	0.003	-4.167	< 0.001
Leaf litter moisture	0.031	0.015	2.080	0.037
Bd infection load				
(Intercept)	2.628	0.533	4.928	< 0.001
Rainfall deviation (1-month lagged)	-0.013	0.005	-2.443	0.014
Proximity to stream	0.742	0.375	1.980	0.047

**Table 1.** Generalized Linear Mixed Models testing for environmental drivers of Bd

 prevalence and infection load in two genera of tropical direct developing anurans.

Prevalence: Sampling area: Variance=0.065, Times series: Variance=1.966,

Corr(ar1)=0.79, N=748; Bd infection load: Variance=0.040, Times series: Variance=0.561, Corr(ar1)=0.81, N=114.

### **Figures legends**

**Figure 1.** Seasonal variation of daily average microclimate temperature (°C) of leaf litter across sampling sites during the course of this study (black line) and historical monthly average temperature (gray line) (A), Monthly rainfall (mm) during the course of this study (black line) and historical monthly rainfall 50 year averages (gray line) (B). During the beginning of summer (October-December/2018), there was a deviation on rainfall availability when compared to historical data.

**Figure 2.** Direct developing genera *Brachycephalus* (A,C) and *Ischnocnema* (B,D), seasonal variation in Bd prevalence (A,B) and average Bd infection loads (C,D).

**Figure 3.** Relationship between 1-month lagged rainfall deviation and Bd infection loads (log<sub>10</sub>-transformed) for both genera combined (A). Violin density plots showing the likelihood of different Bd infection loads when frogs were captured adjacent to streams and away (at least 70 m) from streams (B).

**Figure 4.** Correlation between Bd<sup>+</sup> pumpkin toadlets (*Brachycephalus* sp.) survival rate and Bd load (I.T.S. log<sub>10</sub> transformed).

**Figure 5.** Percentage of live individuals of *Brachycephalus* sp. during field samplings (A) and rainfall deviation (mm) - two months lagged period (B).

**Figure 6.** Dead individual of *Brachycephalus* sp. found near a stream at Serra do Japi (Brazil). Dead individuals carried average Bd infection loads of  $18,146,736 \pm 42,215,558$  SD ITS copies.





















## Figure 6.



## Supporting information

Direct developing species seasonal capture rate separated by distance to streams (Appendix S1).

## **Supporting information**



**Appendix S1**. Direct devleoping species capture rate throughout the sampling year for plots adjacent to streams (black line; cross represents average on each field campaign) and plots away from streams (gray line; circle represents average on each field campaign).

### FINAL CONSIDERATIONS

Here we present the effect of climatic variations and micro environmental factors on the risk of chytridiomycosis in direct-developing amphibian populations. Our analyses showed that spatial variables determined the prevalence of Bd, where lower elevations and litter moisture positively affected Bd presence in anuran populations. Regarding Bd infection load, we observed an influence of both spatial and temporal variables. In particular, there was a delayed effect of the infection after a month of drought during the reproductive season. This drought period also explained the mortality event of *Brachycephalus sp.* observed during our sampling. Thus, we described the first real-time record of chytridiomycosis in a natural environment in Brazil.

Chytridiomycosis is still an imminent risk for amphibian species with different life histories and habitat requirements. In particular, we showed that shifts in micro-environmental conditions and climate have the potential to expose truly terrestrial species to an aquatic fungus. Amphibians with direct development comprise a significant biomass of anuran fauna in the Atlantic Forest. Still, most studies focus on aquatic species. Understanding the dynamics of this emerging disease is essential for identifying vulnerable groups for conservation actions.

### REFERENCES

- Abatzoglou, J. T., S. Z. Dobrowski, S. A. Parks, and K. C. Hegewisch. 2018. TerraClimate, a high-resolution global dataset of monthly climate and climatic water balance from 1958-2015. Scientific Data 5:1–12.
- Adams, A. J., S. J. Kupferberg, M. Q. Wilber, A. P. Pessier, M. Grefsrud, S. Bobzie, V. T. Vredenburg, and C. J. Briggs. 2017. Extreme drought, host density, sex, and bullfrogs influence fungal pathogen infection in a declining lotic amphibian. Ecosphere 8.
- Altizer, S., A. Dobson, P. Hosseini, P. Hudson, M. Pascual, and P. Rohani. 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. Ecology Letters 9:467–484.
- Archaux, F., and V. Wolters. 2006. Impact of summer drought on forest biodiversity: What do we know? Annals of Forest Science 63:645–652.
- Ari, T., S. Neerinckx, K. L. Gage, K. Kreppel, A. Laudisoit, H. Leirs, and N. C. Stenseth. 2011. Plague and climate: Scales matter. PLoS Pathogens 7.
- Arraut, J. M., C. Nobre, H. M. J. Barbosa, G. Obregon, and J. Marengo. 2012. Aerial rivers and lakes: Looking at large-scale moisture transport and its relation to Amazonia and to subtropical rainfall in South America. Journal of Climate 25:543–556.
- Becker, C. G., M. C. Bletz, S. E. Greenspan, D. Rodriguez, C. Lambertini, T. S. Jenkinson, P. R. Guimarães, A. P. A. Assis, R. Geffers, M. Jarek, L. F. Toledo, M. Vences, and C. F. B. Haddad. 2019. Low-load pathogen spillover predicts shifts in skin microbiome and survival of a terrestrial-breeding amphibian. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 286:20191114.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, R. F. Batista, and P. I. Prado. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. Science 318:1775–1777.
- Becker, C. G., D. Rodriguez, C. Lambertini, L. F. Toledo, and C. F. B. Haddad. 2016a. Historical dynamics of Batrachochytrium dendrobatidis in Amazonia. Ecography 39:954–960.
- Becker, C. G., D. Rodriguez, A. V. Longo, L. F. Toledo, C. Lambertini, D. S. Leite, C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio. 2016b. Deforestation, host community structure, and

amphibian disease risk. Basic and Applied Ecology 17:72–80.

- Benício, R. A., T. Carvalho, M. D. R. Barbosa, J. de M. Costa, F. C. C. da Silva, and M. G. Fonseca. 2019. Worrying News for Brazilian Caatinga: Prevalence of Batrachochytrium dendrobatidis in Amphibians. Tropical Conservation Science 12.
- Berger, L., A. D. Hyatt, R. Speare, and J. E. Longcore. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms 68:51–63.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D. E. Green, A. A. Cunningham, C. L. Goggin, R.
  Slocombe, M. A. Ragan, A. D. Hyatt, K. R. McDonald, H. B. Hines, K. R. Lips, G.
  Marantelli, and H. Parkes. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America.
  Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:9031–9036.
- Bletz, M. C., A. H. Loudon, M. H. Becker, S. C. Bell, D. C. Woodhams, K. P. C. Minbiole, and R. N. Harris. 2013. Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: Characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. Ecology Letters 16:807–820.
- Boers, N., N. Marwan, H. M. J. Barbosa, and J. Kurths. 2017. A deforestation-induced tipping point for the South American monsoon system. Scientific Reports 7:1–9.
- Bornschein, M. R., M. R. Pie, and L. Teixeira. 2019. Conservation status of Brachycephalus toadlets (Anura: Brachycephalidae) from the Brazilian Atlantic rainforest. Diversity 11:9–11.
- Bovo, R. P., D. V. Andrade, L. F. Toledo, A. V. Longo, D. Rodriguez, C. F. B. Haddad, K. R. Zamudio, and C. G. Becker. 2016. Physiological responses of Brazilian amphibians to an enzootic infection of the chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis. Diseases of Aquatic Organisms 117:245–252.
- Boyle, D. G., D. B. Boyle, V. Olsen, J. A. T. Morgan, and A. D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Diseases of Aquatic Organisms 60:141–148.

- Brooks, M. E., K. Kristensen, K. J. van Benthem, A. Magnusson, C. W. Berg, A. Nielsen, H. J. Skaug, M. Mächler, and B. M. Bolker. 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. R Journal 9:378–400.
- Burrowes, P. A., R. L. Joglar, and D. E. Green. 2004. Potential Causes for Amphibian Declines in Puerto Rico. Herpetologica 60:141–154.
- Burrowes, P. A., A. V. Longo, and C. A. Rodriguez. 2008. Potential fitness cost of Batrachochytrium dendrobatidis in *Eleutherodactylus coqui*, and comments on environment-related risk of infection. Herpetotropicos 4:51–57.
- Byrne, A. Q., V. T. Vredenburg, A. Martel, F. Pasmans, R. C. Bell, D. C. Blackburn, M. C.
  Bletz, J. Bosch, C. J. Briggs, R. M. Brown, A. Catenazzi, M. F. López, R. Figueroa-Valenzuela, S. L. Ghose, J. R. Jaeger, A. J. Jani, M. Jirku, R. A. Knapp, A. Muñoz, D.
  M. Portik, C. L. Richards-Zawacki, H. Rockney, S. M. Rovito, T. Stark, H. Sulaeman, N.
  T. Tao, J. Voyles, A. W. Waddle, Z. Yuan, and E. B. Rosenblum. 2019. Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation.
  Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116:20382–20387.
- Carvalho, T., C. Guilherme Becker, and L. F. Toledo. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 284.
- Catenazzi, A., A. Swei, J. Finkle, E. Foreyt, L. Wyman, and V. T. Vredenburg. 2017. Epizootic to enzootic transition of a fungal disease in tropical Andean frogs: Are surviving species still susceptible? PLoS ONE 12:1–17.
- Clark, J. S., L. Iverson, C. W. Woodall, C. D. Allen, D. M. Bell, D. C. Bragg, A. W.
  D'Amato, F. W. Davis, M. H. Hersh, I. Ibanez, S. T. Jackson, S. Matthews, N. Pederson,
  M. Peters, M. W. Schwartz, K. M. Waring, and N. E. Zimmermann. 2016. The impacts of increasing drought on forest dynamics, structure, and biodiversity in the United States.
  Global change biology 22:2329–2352.
- Cohen, J. M., M. D. Venesky, E. L. Sauer, D. J. Civitello, T. A. McMahon, E. A. Roznik, and J. R. Rohr. 2017. The thermal mismatch hypothesis explains host susceptibility to an emerging infectious disease. Ecology Letters 20:184–193.

- Condez, T. H., C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio. 2020. Historical biogeography and multi-trait evolution in miniature toadlets of the genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae). Biological Journal of the Linnean Society:1–23.
- Elderd, B. D., and J. R. Reilly. 2014. Warmer temperatures increase disease transmission and outbreak intensity in a host-pathogen system. Journal of Animal Ecology 83:838–849.
- Epstein, P. R. 2001. Climate change and emerging infectious diseases. Microbes and Infection 3:747–754.
- Fauchereau, N., S. Trzaska, M. Rouault, and Y. Richard. 2003. Rainfall variability and changes in Southern Africa during the 20th century in the global warming context. Natural Hazards 29:139–154.
- Frost, D. R. 2020. Amphibian Species of the World: an Online Reference. https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php.
- Garner, T. W. J., S. Walker, J. Bosch, S. Leech, J. M. Rowcliffe, A. A. Cunningham, and M. C. Fisher. 2009. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. Oikos 118:783–791.
- Gervasi, S. S., P. R. Stephens, J. Hua, C. L. Searle, G. Y. Xie, J. Urbina, D. H. Olson, B. A. Bancroft, V. Weis, J. I. Hammond, R. A. Relyea, and A. R. Blaustein. 2017. Linking ecology and epidemiology to understand predictors of multi-host responses to an emerging pathogen, the amphibian chytrid fungus. PLoS ONE 12:1–23.
- Greenspan, S. E., D. S. Bower, R. J. Webb, L. Berger, D. Rudd, L. Schwarzkopf, and R. A. Alford. 2017. White blood cell profiles in amphibians help to explain disease susceptibility following temperature shifts. Developmental and Comparative Immunology 77:280–286.
- Greenspan, S. E., C. Lambertini, T. Carvalho, T. Y. James, L. F. Toledo, C. F. B. Haddad, and C. G. Becker. 2018. Hybrids of amphibian chytrid show high virulence in native hosts. Scientific Reports 8:1–10.
- Gründler, M. C., L. F. Toledo, G. Parra-Olea, C. F. B. Haddad, L. O. M. Giasson, R. J.
  Sawaya, C. P. A. Prado, O. G. S. Araujo, F. J. Zara, F. C. Centeno, and K. R. Zamudio.
  2012. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of Batrachochytrium dendrobatidis in Brazilian anuran assemblages.

Diseases of Aquatic Organisms 97:173–184.

- Guilherme Becker, C., M. C. Bletz, S. E. Greenspan, D. Rodriguez, C. Lambertini, T. S. Jenkinson, P. R. Guimarães, A. P. A. Assis, R. Geffers, M. Jarek, L. F. Toledo, M. Vences, and C. F. B. Haddad. 2019. Low-load pathogen spillover predicts shifts in skin microbiome and survival of a terrestrial-breeding amphibian. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 286.
- Guilherme Becker, C., D. Rodriguez, L. Felipe Toledo, A. V. Longo, C. Lambertini, D. T. Corrêa, D. S. Leite, C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio. 2014. Partitioning the net effect of host diversity on an emerging amphibian pathogen. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 281.
- Heyer, W. R., A. S. Rand, C. Alberto, and L. Peixoto. 2013. Decimations, Extinctions, and Colonizations of Frog Populations in and Colonizations Extinctions, Southeast Brazil and Their Evolutionary. Biotropica 20:230–235.
- Hirschfeld, M., D. C. Blackburn, T. M. Doherty-Bone, L. G. N. Gonwouo, S. Ghose, and M. O. Rödel. 2016. Dramatic Declines of Montane Frogs in a Central African Biodiversity Hotspot. PloS one 11:e0155129.
- Hyatt, A. D., D. G. Boyle, V. Olsen, D. B. Boyle, L. Berger, D. Obendorf, A. Dalton, K. Kriger, M. Hero, H. Hines, R. Phillott, R. Campbell, G. Marantelli, F. Gleason, and A. Colling. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms 73:175–192.
- IUCN. 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. http://www.iucnredlist.org.
- Jenkinson, T. S., C. M. Betancourt Román, C. Lambertini, A. Valencia-Aguilar, D.
  Rodriguez, C. H. L. Nunes-De-Almeida, J. Ruggeri, A. M. Belasen, D. da Leite Silva, K.
  R. Zamudio, J. E. Longcore, L. F. Toledo, and T. Y. James. 2016. Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations.
  Molecular Ecology 25:2978–2996.
- Jones, K. E., N. Patel, M. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. Gittleman, and P. Daszak. 2008. Global trends in emerging infectious diseases Kate. Nature 44:319–335.
- Kiesecker, J. M. 2011. Global stressors and the global decline of amphibians: Tipping the stress immunocompetency axis. Ecological Research 26:897–908.

- Kolby, J. E., S. D. Ramirez, L. Berger, K. L. Richards-Hrdlicka, M. Jocque, and L. F. Skerratt. 2015. Terrestrial dispersal and potential environmental transmission of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). PLoS ONE 10:1–13.
- Leitão-Filho, H. F. 1992. A flora arbórea da Serra do Japi. Pages 40–63 in L. P. C. Morelatto, editor. História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Editora da UNICAMP, Campinas.
- Leite-Filho, A. T., M. H. Costa, and R. Fu. 2019. The southern Amazon rainy season: The role of deforestation and its interactions with large-scale mechanisms. International Journal of Climatology.
- Li, Y., J. M. Cohen, and J. R. Rohr. 2013. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. Integrative Zoology 8:145–161.
- Lips, K. R., J. D. Reeve, and L. R. Witters. 2003. Ecological Traits Predicting Amphibian Population Declines in Central America. Conservation Biology 17:1078–1088.
- Longcore, J. E., A. P. Pessier, D. K. Nichols, J. E. Longcorel, A. P. Pessier, and D. K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians 91:219–227.
- Longo, A. V., and P. A. Burrowes. 2010. Persistence with chytridiomycosis does not assure survival of direct-developing frogs. EcoHealth 7:185–195.
- Longo, A. V., P. A. Burrowes, and R. L. Joglar. 2010. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. Diseases of Aquatic Organisms 92:253–260.
- Longo, A. V., R. J. Ossiboff, K. R. Zamudio, and P. A. Burrowes. 2013. Lability in host defenses: Terrestrial frogs die from chytridiomycosis under enzootic conditions. Journal of Wildlife Diseases 49:197–199.
- Loo, Y. Y., L. Billa, and A. Singh. 2015. Effect of climate change on seasonal monsoon in Asia and its impact on the variability of monsoon rainfall in Southeast Asia. Geoscience Frontiers 6:817–823.
- Malhi, Y., and J. Wright. 2004. Spatial patterns and recent trends in the climate of tropical rainforest regions. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 359:311–329.

- Mesquita, A. F. C., C. Lambertini, M. Lyra, L. R. Malagoli, T. Y. James, L. F. Toledo, C. F. B. Haddad, and C. G. Becker. 2017. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. Scientific Reports 7:1–7.
- Morand, S., K. A. Owers, A. Waret-Szkuta, K. M. McIntyre, and M. Baylis. 2013. Climate variability and outbreaks of infectious diseases in Europe. Scientific Reports 3:1–6.
- Morelatto, L. P. C. 1992. História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Page (L. P. C. Morelatto, Ed.). Editora da UNICAMP, Campinas.
- Muletz-Wolz, C. R., S. E. Barnett, G. V. DiRenzo, K. R. Zamudio, L. F. Toledo, T. Y. James, and K. R. Lips. 2019. Diverse genotypes of the amphibian-killing fungus produce distinct phenotypes through plastic responses to temperature. Journal of Evolutionary Biology 32:287–298.
- Narisma, G. T., J. A. Foley, R. Licker, and N. Ramankutty. 2007. Abrupt changes in rainfall during the twentieth century. Geophysical Research Letters 34:1–5.
- Neely, W. J., S. E. Greenspan, L. P. Ribeiro, T. Carvalho, R. A. Martins, D. Rodriguez, J. R. Rohr, C. F. B. Haddad, L. F. Toledo, and C. G. Becker. 2020. Synergistic effects of warming and disease linked to high mortality in cool-adapted terrestrial frogs. Biological Conservation 245:108521.
- Piotrowski, J. S., S. L. Annis, and J. E. Longcore. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. Mycologia 96:9–15.
- Piovia-Scott, J., D. Rejmanek, D. C. Woodhams, S. J. Worth, H. Kenny, V. McKenzie, S. P. Lawler, and J. E. Foley. 2017. Greater Species Richness of Bacterial Skin Symbionts Better Suppresses the Amphibian Fungal Pathogen Batrachochytrium Dendrobatidis. Microbial Ecology 74:217–226.
- Pounds, J. A., M. R. Bustamante, L. A. Coloma, J. A. Consuegra, M. P. L. Fogden, P. N. Foster, E. La Marca, K. L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S. R. Ron, G. A. Sánchez-Azofeifa, C. J. Still, and B. E. Young. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. Nature 439:161–167.
- Preuss, J. F., C. Lambertini, D. da S. Leite, L. F. Toledo, and E. M. Lucas. 2016. Crossing the threshold: an amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium*

*dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. Studies on Neotropical Fauna and Environment 51:68–77.

- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/. Vienna, Austria.
- Raffel, T. R., N. T. Halstead, T. A. McMahon, A. K. Davis, and J. R. Rohr. 2015. Temperature variability and moisture synergistically interact to exacerbate an epizootic disease. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 282.
- Rebouças, R., A. B. Carollo, M. de O. Freitas, C. Lambertini, R. M. N. Dos Santos, and L. F. Toledo. 2019. Is the conspicuous dorsal coloration of the atlantic forest pumpkin toadlets aposematic? Salamandra 55:39–47.
- Reither, P. 2001. Climate Change and mosquito-borne disease. Environment International 109:141–161.
- Ribeiro, L. P., T. Carvalho, C. G. Becker, T. S. Jenkinson, D. da S. Leite, T. Y. James, S. E. Greenspan, and L. F. Toledo. 2019. Bullfrog farms release virulent zoospores of the frog-killing fungus into the natural environment. Scientific Reports 9:1–10.
- Ribeiro, R. da S., G. T. B. T. do Egito, and C. F. B. Haddad. 2005. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiaí da Serra do Japi, Estado de São Paulo. Biota Neotropica 5:235–247.
- Rocha, C. F. D., D. Vrcibradic, M. C. Kiefer, M. Almeida-Gomes, V. N. T. Borges-Junior, P. C. F. Carneiro, R. V. Marra, P. Almeida-Santos, C. C. Siqueira, P. Goyannes-Araújo, C. G. A. Fernandes, E. C. N. Rubião, and M. Van Sluys. 2007. A survey of the leaf-litter frog assembly from an Atlantic forest area (Reserva Ecológica de Guapiaçu) in Rio de Janeiro State, Brazil, with an estimate of frog densities. Tropical Zoology 20:99–108.
- Rodrigues, R. R., L. P. C. Morelatto, C. A. Joly, and H. F. Leitão-Filho. 1989. Estudo florístico e fitosociológico em um gradiente altitudinal de mata estacional mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiaí, SP. Revista Brasileira Botânica 12:71–84.
- Rodriguez, D., C. G. Becker, N. C. Pupin, C. F. B. Haddad, and K. R. Zamudio. 2014. Longterm endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. Molecular Ecology 23:774–787.

- Rohr, J. R., and T. R. Raffel. 2010. Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:8269–8274.
- Rohr, J. R., T. R. Raffel, J. M. Romansic, H. McCallum, and P. J. Hudson. 2008. Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:17436–17441.
- Rollins-Smith, L. A. 2017. Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. Developmental and Comparative Immunology 66:111–119.
- Ruggeri, J., S. P. De Carvalho-E-silva, T. Y. James, and L. F. Toledo. 2018. Amphibian chytrid infection is influenced by rainfall seasonality and water availability. Diseases of Aquatic Organisms 127:107–115.
- Sapsford, S. J., R. A. Alford, and L. Schwarzkopf. 2013. Elevation, temperature, and aquatic connectivity all influence the infection dynamics of the amphibian chytrid fungus in adult frogs. PLoS ONE 8:1–12.
- Scheele, B. C., F. Pasmans, L. F. Skerratt, L. Berger, A. Martel, W. Beukema, A. A. Acevedo,
  P. A. Burrowes, T. Carvalho, A. Catenazzi, I. De la Riva, M. C. Fisher, S. V. Flechas, C.
  N. Foster, P. Frías-Álvarez, T. W. J. Garner, B. Gratwicke, J. M. Guayasamin, M.
  Hirschfeld, J. E. Kolby, T. A. Kosch, E. La Marca, D. B. Lindenmayer, K. R. Lips, A. V.
  Longo, R. Maneyro, C. A. McDonald, J. Mendelson, P. Palacios-Rodriguez, G. ParraOlea, C. L. Richards-Zawacki, M.-O. Rödel, S. M. Rovito, C. Soto-Azat, L. F. Toledo, J.
  Voyles, C. Weldon, S. M. Whitfield, M. Wilkinson, K. R. Zamudio, and S. Canessa.
  2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity.
  Science 363:1459–1463.
- Skerratt, L. F., L. Berger, R. Speare, S. Cashins, K. R. McDonald, A. D. Phillott, H. B. Hines, and N. Kenyon. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. EcoHealth 4:125–134.
- Stevenson, L. A., R. A. Alford, S. C. Bell, E. A. Roznik, L. Berger, and D. A. Pike. 2013. Variation in thermal performance of a widespread pathogen, the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. PloS one 8:e73830.
- Stewart, M. M. 1995. Climate Driven Population Fluctuations in Rain Forest Frogs. Journal of Herpetology 29:437.

- Valencia-Aguilar, A., G. Ruano-Fajardo, C. Lambertini, D. D. S. Leite, L. F. Toledo, and T. Mott. 2015. Chytrid fungus acts as a generalist pathogen infecting species-rich amphibian families in Brazilian rainforests. Diseases of Aquatic Organisms 114:61–67.
- Van Rooij, P., A. Martel, F. Haesebrouck, and F. Pasmans. 2015. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. Veterinary Research 46:1–22.
- Venesky, M. D., M. J. Parris, and A. Storfer. 2009. Impacts of Batrachochytrium dendrobatidis infection on tadpole foraging performance. EcoHealth 6:565–575.
- Voyles, J., L. R. Johnson, J. Rohr, R. Kelly, C. Barron, D. Miller, J. Minster, and E. B. Rosenblum. 2017. Diversity in growth patterns among strains of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* across extended thermal optima. Oecologia 184:363–373.
- Voyles, J., V. T. Vredenburg, T. S. Tunstall, J. M. Parker, C. J. Briggs, and E. B. Rosenblum. 2012. Pathophysiology in mountain yellow-legged frogs (Rana muscosa) during a chytridiomycosis outbreak. PloS one 7.
- Walls, S. C., W. J. Barichivich, and M. E. Brown. 2013. Drought, deluge and declines: The impact of precipitation extremes on amphibians in a changing climate. Biology 2:399– 418.
- Wells, K. D. 2010. The ecology and behavior of amphibians. Page (K. D. Wells, Ed.). University of Chicago Press, Chicago.
- 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.
- Whitfield, S. M., J. Kerby, L. R. Gentry, and M. A. Donnelly. 2012. Temporal Variation in Infection Prevalence by the Amphibian Chytrid Fungus in Three Species of Frogs at La Selva, Costa Rica. Biotropica 44:779–784.
- Woodhams, D. C., R. A. Alford, R. E. Antwis, H. Archer, M. H. Becker, L. K. Belden, S. C.
  Bell, M. Bletz, J. H. Daskin, L. R. Davis, S. V. Flechas, A. Lauer, A. Gonzalez, R. N.
  Harris, W. M. Holden, M. C. Hughey, R. Ibáñez, R. Knight, J. Kueneman, F.
  Rabemananjara, L. K. Reinert, L. A. Rollins-Smith, F. Roman-Rodriguez, S. D. Shaw, J.

B. Walke, and V. McKenzie. 2015. Antifungal isolates database of amphibian skinassociated bacteria and function against emerging fungal pathogens. Ecology 96:595– 595.

### 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) 1
- Anexo IV. Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNICAMP) 2
- Anexo V. Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNICAMP) 3
- Anexo VI. 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: 61220-2	Data da Emissão: 13/12/2017 10:47	Data para Revalidação*: 12/01/2019	
* 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: CARLOS GUILHERME BECKER	CPF: 986.092.110-53
Título do Projeto: Efeito da sazonalidade no risco de quitridiomicose em anfíbios com desenvol	vimento direto
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	Amostragens de campo para detecção do fungo quitridio nos anfíbios ao longo de dois anos	01/2018	04/2020

#### Observações e ressalvas

	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e
1	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.
	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem
2	como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da
2	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.
	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
3	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.
	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,
4	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.
	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,
5	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.
	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional na

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.
 7 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.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Diego de Moura Campos	Colaborador	442.137.968-92	456799424 SSP-SP	Brasileira
2	Célio Fernando Batista Haddad	Colaborador	064.348.668-28	10.946.838 SSP/SP-SP	Brasileira
3	RENATO AUGUSTO MARTINS	Colaborador	346.460.708-98	34915729-7 SSP-SP	Brasileira
4	LUIS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA	Coordenador	289.618.908-40	28.465.361-5 SSP-SP	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Тіро
1	JUNDIAI	SP	Serra do Japi	Fora de UC Federal
2	SAO LUIS DO PARAITINGA	SP	PESM, Nucleo Santa Virginia	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Ischnocnema guentheri, Ischnocnema parva, Ischnocnema henselii, Haddadus binotatus, Brachycephalus pitanga, Brachycephalus ephippium

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: 93715249







Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

 Número: 61220-2
 Data da Emissão: 13/12/2017 10:47
 Data para Revalidação\*: 12/01/2019

 \* 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: CARLOS GUILHERME BECKER	CICDIC	CPF: 986.092.110-53	
Título do Projeto: Efeito da sazonalidade no risco d	e quitridiomicose em anfíbios com desenvol	vimento direto	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUA	DE CAMPINAS		CNPJ: 46.068.425/0001-33

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas(swab / esfregaço da secreção da pele)
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual
3	Método de marcação (Anfíbios)	Outros métodos de marcação(Fotografias serA£o utilizadas na identificaA§A£o dos indivA-duos)

#### 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: 93715249



Página 2/3



Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

#### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61220-2	Data da Emissão: 13/12/2017 10:47	Data para Revalidação*: 12/01/2019	
* 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 dia:			
a contar da data do aniversário de sua emissão.			

#### Dados do titular

Nome: CARLOS GUILHERME BECKER	CPF: 986.092.110-53				
Título do Projeto: Efeito da sazonalidade no risco de quitridiomicose em anfíbios com desenvolvimento direto					
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: 93715249



Página 3/3

### 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: 27745-17
 Data da Emissão: 14/11/2018 15:46:43
 Data da Revalidação\*: 14/11/2019

 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

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	captura e coleta de animais em campo	08/2014	06/2022

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Carolina Lambertini	Pesquisadora	360.051.528-40	Brasileira
2	Camila Inés Zornosa Torres	Colaboradora	236.898.378-39	Estrangeira
3	DOMINGOS DA SILVA LEITE	Pesquisador	016.488.478-54	Brasileira
4	Tamilie Carvalho	Colaborador	367.720.108-09	Brasileira
5	GUILHERME AUGUSTO ALVES	Pesquisador	401.739.638-03	Brasileira
6	Luisa de Pontes Ribeiro	Pesquisador	384.418.958-05	Brasileira
7	Mariana Retuci Pontes	pesquisadora	421.095.958-84	Brasileira
8	VICTOR FÁVARO AUGUSTO	técnico	407.555.738-38	Brasileira
9	RAONI REBOUÇAS SANTOS	Pesquisador	013.097.585-06	Brasileira
10	Janaina de Andrade Serrano	Pesquisador	409.749.308-65	Brasileira
11	Diego de Moura Campos	Pesquisador	442.137.968-92	Brasileira
12	Raquel Fernanda Salla	Pesquisador	391.324.528-61	Brasileira
13	Mariane de Oliveira Freitas	Pesquisador	398.105.658-28	Brasileira

#### Observações e ressalvas

1	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.
2	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, oblidos 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.
3	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.
4	Esta autorização NÃO exime 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.
5	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 específica 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.

Este documento 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: 0277451720181114

Página 1/5



Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-17 Data da Emissão: 14/11/2018 15:46:43 Data da Revalidação\*: 14/11/2019 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.

-	 	 
1000		 
1.1210	 	 

Dados do titular	
Nome: LUÍS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA	CPF: 289.618.908-40

#### Observações e ressalvas

6	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.
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 genéfico, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja
	maiores informações em www.mma.gov.br/ogen.

#### Outras ressalvas

1	O(a) pesquisador(a) deverá contatar a Sede do PNC para O AGENDAMENTO prévio de visitas,	PARNA do Caparaó
	a ser realizado antes do inicio das atividades de campo, com ANTECEDÊNCIA MÍNIMA DE	
	15 DIAS, pelo e-mail pesquisa.prcaparao@gmail.com, informando seu cronograma, itinerário e	
	demais assuntos pertinentes à pesquisa.	
	A quantidade a ser coletada deve ser cautelosamente analisada quanto a real necessidade,	
	evitando-se atingir o número solicitado.	
	Os resultados e publicações geradas relativas à pesquisa em tela deverão ser encaminhados	
	ao PNC.	
2	O pesquisador deverá entrar em contato com a unidade de conservação previamente ao	CR 11 Lagoa Santa-MG
	início dos trabalhos de campo com o objetivo de comunicar o início dos trabalhos de pesquisa.	
3	O titular da solicitação deverá entrar em contato com o ICMBIO Fernando de Noronha via	PARNA Marinho de Fernando de Noronha
	e-mail (pesquisaparnamarfn@gmail.com) informando o período das expedições a FN e	
	deverá apresentar cronograma de atividades no escritório do ICMBio antes do início dos	
	trabalhos em Fernando de Noronha especificando os locais de trabalho de campo. Os trabalhos	
	de campo poderão deverão ser acompanhados por servidor do NGI-FN1CMBio, à oritério da	
	chefia. O pesquisador titular deverá encaminhar ao NGI-FN1CMBio cópia digital das	
	publicações resultantes do Estudo.	
4	O titular da solicitação deverá entrar em contato com o ICMBIO FN via e-mail	APA Fernando de Noronha
I 1	(pesquisaparnamartn@gmail.com) informando o período das expedições a FN e deverá	
	apresentar cronograma de atividades no escritório do ICMBio antes do inicio dos trabalhos em	
	Fernando de Noronha especificando os locais de trabalho de campo. O acesso a áreas fechadas	
	ou em horários fechados à visitação pública deverá constar em cronograma. Os trabalhos	
I 1	de campo poderão deverão ser acompanhados por servidor do NGI-FN1CMBio, à critério da	
	chefia. O pesquisador titular deverà encaminhar ao NGI-FN1CMBio cópia digital das	
	publicações resultantes do Estudo.	

Este documento 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: 0277451720181114

Página 2/5



Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-17	Data da Emissão: 14/11/2018 15:46:43	Data da Revalidação*: 14/11/2019			
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 RAM	NOS PEREIRA		CPF: 289.618.908-40

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Тіро
1	Parque Nacional Marinho de Fernando de	PE	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
	Noronha				
2	Parque Nacional do Caparaó	MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
3	Área de Proteção Ambiental de Fernando	PE	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
	de Noronha - Rocas - São Pedro e São				
	Paulo				
4	Todo Estado	AC	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
5	Todo Estado	AL	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
6	Todo o Estado	MG	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
7	Todo o Estado	BA	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
8	todo o territorio do Estado	ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
9	Todo Estado	GO	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
10	Regiao Costeira	PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
11	Regiao costeira e serras	RS	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
12	Estado todo	SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
13	Regiao Costeira e Planicies	SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Amphibia	10
2	Captura de animais silvestres in situ	Amphibia	-
3	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou	Batrachochytrium	
	microbiológico		

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Anfibios)	Outras amostras biológicas(amostra de pele por swab)
2	Amostras biológicas (Fungos)	Outras amostras biológicas(fungo quitri-dio)
3	Método de captura/coleta (Anfibios)	Armadilha de queda pit fall, Captura manual, Peneira, Puçá,
		Armadilha de queda pit fall
4	Método de captura/coleta (Fungos)	Outros métodos de captura/coleta(Raspagem por swab)
5	(Grupo não identificado)	

Este documento 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: 0277451720181114



Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

 Número: 27745-17
 Data da Emissão: 14/11/2018 15:46:43
 Data da Revalidação\*: 14/11/2019

 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

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	Coleção

Este documento 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: 0277451720181114

Página 4/5



Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27745-17	Data da Emissão: 14/11/2018 15:46:43	Data da Revalidação*: 14/11/2019			
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

#### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, 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 do nível taxonômico possível.

Este documento 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: 0277451720181114

### Anexo III.

NUC T FROM



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>Risco de Quitridiomicose em anfíbios de desenvolvimento direto</u> <u>em anfíbios da Mata Atlântica</u>, registrada com o nº <u>4744-1/2017</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Luis</u> <u>Felipe Toledo e C. Guilherme Becker</u>, 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 <u>07 de dezembro de 2017</u>.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência do projeto:	01/01/2018-28/03/2019		
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/01/2018-28/03/2019		
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbios, Brachycephalidae		
No. de animais:	40		
Idade/Peso:	01 ano / 01g		
Sexo:	20 machos / 20 fêmeas		
Origem:	Parque Estadual Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia (de São Luis do Paraitinga, SP) e na Serra do Japi, no município de Jundiai, SP.		
Biotério onde serão mantidos os animais:	LaDiVert, DBA/IB/UNICAMP		

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, 07 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro 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.





### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado <u>Risco de</u> <u>Quitridiomicose em anfíbios de desenvolvimento direto em anfíbios da Mata</u> <u>Atlântica</u> (protocolo CEUA/UNICAMP nº <u>4744-1/2017</u>), de responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Toledo e como executor o pós-graduando C. Guilherme Becker, teve aprovada a inclusão de novo executor, pós-graduando <u>Diego de</u> <u>Moura Campos</u>.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 07/12/2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Coordenador

Campinas, 03 de julho de 2018.

ND

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

### Anexo IV.





### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>Risco de Quitridiomicose em anfíbios de desenvolvimento</u> <u>direto em anfíbios da Mata Atlântica</u>, registrada com o nº <u>5440-1/2019</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Luis Felipe Toledo e Diego de Moura Campos</u>, 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 14/11/2019.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	05/12/2019 a 25/11/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 25/11/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbio** / n/a
No. de animais:	900
Idade/Peso:	1.00 Anos / 1.00 Gramas
Sexo:	450 Machos 450 Fêmeas
Origem:	Animais serão estudados em campo
Biotério onde serão mantidos os animais:	-Não se aplica-

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

Campinas, 17 de janeiro de 2020.

tim Cozarin

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente

Rosangela dos Santos Secretária Executiva

IMEORTANTE: Pedimos stanção 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 CEUAUNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos. Anexo V.





### INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP -CEUA/UNICAMP - esclarece que houve alteração nos projetos de pesquisa "RISCO DE QUITRIDIOMICOSE EM ANFÍBIOS DE DESENVOLVIMENTO DIRETO EM ANFÍBIOS DA MATA ATLÂNTICA", protocolos CEUA/Unicamp n°.: 4774-1/2017 e 5440-1/2019, de responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Toledo e dos pós-graduandos C. Guilherme Becker e Diego de Moura Campos, para análise desta comissão.

Justificativa: No protocolo inicial os executores informaram que haveria coleta de 40 indivíduos, no entanto, tratava-se de 40 pontos de coleta totalizando 1000 indivíduos. O procedimento adotado foi coleta de amostra por meio de swabing (passagem de cotonete, não invasivo) nos indivíduos ao longo de um ano devido à baixa detectabilidade do fungo na natureza e da escala do estudo. Após alguns meses os pesquisadores observaram que o número de indivíduos aprovados no protocolo era inferior ao número necessário para a realização do estudo, tendo sido submetido um novo protocolo ao Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA/Unicamp n°.: 5440-1/2019).

Esclarecemos que o protocolo CEUA/Unicamp n°.: 4774-1/2017 teve vigência de: 01/01/2018 a 28/03/2019 e o protocolo CEUA/Unicamp n°.: 5440-1/2019 apresenta vigência de: 05/12/2019 a 25/11/2020. Ambos os protocolos referem-se ao mesmo estudo e estão de acordo com as normas vigentes da CEUA.

Campinas, 09 de junho de 2020.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente da CEUA/UNICAMP

### 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 **Risco de quitridiomicose em anfíbios anuros de desenvolvimento direto**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de Agosto de 2020

Assinatura : \_\_\_\_\_\_\_ Nome do(a) autor(a): **Diego de Moura Campos** RG n.º 456799424

Assinatura : \_\_\_\_\_ Nome do(a) orientador(a): **C. Guilherme Becker** RG n.º 4084153719