Monique Nouailhetas Simon

Plasticidade fenotípica em relação à
temperatura de larvas de *Rhinella*
(Anura:Bufonidae) da caatinga e da floresta
atlântica

São Paulo

2010

Monique Nouailhetas Simon

Plasticidade fenotípica em relação à
temperatura de larvas de *Rhinella*
(Anura:Bufonidae) da caatinga e da floresta
atlântica

Temperature-related phenotypic plasticity of
Rhinella tadpoles (Anura:Bufonidae) from the
Brazilian Caatinga and Atlantic rain forest

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Fisiologia Geral, na
Área de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos A.
Navas Iannini

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Nouailhetas Simon, Monique

Plasticidade fenotípica em relação à
temperatura de larvas de *Rhinella*
(Anura:Bufonidae) da caatinga e da floresta
atlântica

111 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

1. Normas de reação de
desenvolvimento 2. Modulação fenotípica 3.
Variação da temperatura

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia
Geral.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr. Carlos A. Navas Iannini

Orientador

Dedicatória

A Viviane Nouailhetas,
mãe e amiga desde meu nascimento,
exemplo para toda a minha vida.

Epígrafe

VERDADE

“A porta da verdade estava aberta,
mas só deixava passar
meia pessoa de cada vez.

Assim não era possível atingir toda a verdade,
porque a meia pessoa que entrava
só trazia o perfil de meia verdade.
E sua segunda metade
voltava igualmente com meio perfil.
E os meios perfis não coincidiam.

Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta.
Chegaram ao lugar luminoso
onde a verdade esplendia seus fogos.
Era dividida em metades
diferentes uma da outra.

Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.
Nenhuma das duas era totalmente bela.
E carecia optar. Cada um optou conforme
seu capricho, sua ilusão, sua miopia.”

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Carlos Navas, pelo apoio, pelas discussões teóricas e pela liberdade de traçar meu próprio caminho no mestrado.

Agradeço a Francisco de Assis e sua família pela muito importante ajuda de campo em São Miguel e por sempre me acolherem com carinho.

Agradeço aos amigos do laboratório de Ecofisiologia e do departamento de Fisiologia pela ajuda em campo e por discussões e avaliações de apresentações, especialmente a Pedro Leite Ribeiro, pela colaboração na pesquisa (por vezes árdua), pelas viagens de campo divertidas (e às vezes abruptas) e pelos empréstimos de carro.

Agradeço aos amigos que me ajudaram em campo: Maysa, Marcelo, Mauro, Renato, Pedro, Joana e Fabiano.

Agradeço aos professores que colaboraram com meu amadurecimento científico: José Eduardo de Carvalho, Fernando Gomes e José Guilherme.

Agradeço ao meu irmão, Ricardo, por revisar o inglês do resumo desta dissertação, e à minha mãe, Viviane, pelas discussões sobre o trabalho.

Agradeço aos motoristas do Instituto de Biociências pelas viagens de campo.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro como bolsa e como auxílio à pesquisa.

Agradeço ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia pelo uso de carros e infra-estrutura.

Agradeço à direção e administração da Estação Biológica de Boracéia por autorizar a minha pesquisa e prover a minha estadia em campo.

Agradeço aos meus amigos pelo suporte e pela companhia agradável que eles sempre foram e serão: Mazó, Talita, Camila, Chicão, João, Caqui, Cris, Liss, Letícia, Nina, Michele, End, Marcelo.

Finalmente, mas não de menos importância, agradeço à minha família por compartilhar alegrias e tristezas, e pelos ensinamentos de vida que me passaram.

Índice

Introdução

1. Plasticidade fenotípica.....	10
2. Plasticidade fenotípica e Normas de reação de desenvolvimento.....	14
3. Mudanças ambientais e Normas de reação.....	16
4. A caatinga como um novo ambiente e a Fauna de anfíbios anuros.....	19
5. Plasticidade fenotípica em larvas de anfíbios anuros.....	21
6. Abordagem comparativa de normas de reação.....	23
7. O fator temperatura na caatinga e Normas de reação térmicas em larvas de anuros.....	25

Objetivos

1. Objetivo geral.....	28
2. Objetivos específicos.....	28

Materiais e Métodos

1. Locais de estudo.....	29
2. Espécies.....	29
3. Coleta de dados climáticos em campo.....	32
4. Caracterização dos microhabitats larvais.....	33
5. Distribuição natural de massa estágio-específica.....	33

6. Experimentos de campo.....	34
6.1. <i>Rhinella ornata</i> e <i>Rhinella ictérica</i>	34
6.2. <i>Rhinella granulosa</i>	34
7. Experimentos de laboratório.....	40
7.1. Normas de reação de variação térmica.....	40
7.2. Normas de reação de Temperatura Crítica Máxima.....	47
8. Análise Estatística.....	49

Resultados

1. Clima dos locais de estudo.....	50
2. Descrição dos microhabitats larvais de <i>Rhinella</i>	52
3. Distribuição natural de massa estágio-específica.....	56
4. Experimentos de campo.....	57
4.1. Plasticidade de massa em <i>R. ictérica</i>	57
4.2. Curvas de sobrevivência.....	58
4.3. Massa das fêmeas e dos cordões de <i>R. granulosa</i>	59
5. Experimentos de laboratório.....	59
5.1. Desenvolvimento de <i>R. ornata</i> e <i>R. ictérica</i>	59
5.1.1. Regimes térmicos simulados.....	59
5.1.2. Curvas de sobrevivência.....	61
5.1.3. Normas de reação bivariadas.....	62
5.1.4. Efeitos da moda e da variação térmica.....	62
5.1.5. Normas de reação de variação térmica.....	68
5.2. Normas de reação de Temperatura Crítica Máxima.....	68

Discussão

1. Heterogeneidade ambiental.....	71
2. Heterogeneidade ambiental e Plasticidade da massa larval.....	74
3. Sobrevivência.....	76
4. Normas de reação bivariadas das espécies de floresta atlântica.....	77
5. Efeitos da moda e da variação térmica nas espécies de floresta atlântica.....	79
6. Normas de reação de variação térmica das espécies de floresta atlântica.....	82
7. Normas de reação de Temperatura Crítica Máxima.....	87
8. Especulações sobre a plasticidade de desenvolvimento de <i>R. granulosa</i> e Considerações finais.....	89
Conclusões.....	91
Resumo.....	93
<i>Abstract</i>.....	94
Referências Bibliográficas.....	95
Anexos.....	103

Introdução

1. Plasticidade Fenotípica

O conceito de plasticidade fenotípica é muito relevante em questões que envolvem a interface entre ecologia e evolução. Sua definição é a habilidade de um único genótipo expressar formas alternativas de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento em resposta às condições ambientais (West-Eberhard, 1989). A grande vantagem que um fenótipo plástico teria sobre um fenótipo fixo (especialista) é de poder se ajustar à variação ambiental e não somente a um único ambiente. A importância do ambiente na nova síntese da teoria evolutiva não foi explicitada em toda sua magnitude (Schlichting e Pigliucci, 1998). Na visão tradicional, o ambiente refletia simplesmente as pressões de seleção atuando nos indivíduos de uma população. A variação ambiental era considerada como ruído, uma “fonte de erro que reduz a precisão de estudos genéticos”, como escreveu Falconer em seu livro de genética quantitativa (Falconer e Mackay, 1996). Ou seja, a visão era de que o ambiente, por ser um efeito não genético, não contribui diretamente para a mudança evolutiva, uma vez que evolução seja definida como mudança de frequência de genes de uma geração a outra (West-Eberhard, 1989). No entanto, ao pensarmos em plasticidade, compreendemos que o ambiente, além de selecionar variantes fenotípicas, produz os variantes por meio de sua interação com a genética. Ou seja, a variação ambiental contribui para a variação fenotípica, o substrato da seleção natural.

A visão tradicional do processo evolutivo ignora fatos conhecidos de longa data em biologia. Estímulos ambientais ao longo da ontogenia podem gerar alterações nas vias de desenvolvimento ou até mesmo ativação de vias distintas, formando fenótipos alternativos (West-Eberhard, 1989). Essa concepção de que eventos de desenvolvimento podem gerar mudanças fenotípicas de importância evolutiva remete à década de 1940, e inclui autores como Schmalhausen e Waddington. Fenômenos como heterocronia (mudança no tempo relativo de eventos do desenvolvimento em relação ao ancestral) e heterotopia (mudança no local de um determinado evento de desenvolvimento em relação ao ancestral) são importantes causas de mudanças fenotípicas entre populações (Schlichting e Pigliucci, 1998). Essas mudanças no

desenvolvimento são irreversíveis, pois há fixação da alteração da via de desenvolvimento. Um exemplo dessa plasticidade irreversível é da metamorfose facultativa em anfíbios (Semlitsch, 1987). Porém, mudanças fenotípicas reversíveis durante a ontogenia também podem ser importantes em eventos evolutivos, como sugerido no trabalho de (Gomez-Mestre e Buchholz, 2006).

Recentemente, o debate sobre a importância do ambiente e da plasticidade fenotípica em evolução culminou em hipóteses alternativas sobre a existência de um controle genético para a plasticidade. Sara Via, uma geneticista, publicou um artigo em 1993 que defende que a plasticidade é um sub-produto da seleção natural, e não um caráter em si, com base genética (Via, 1993). Sua argumentação fundamentou-se na idéia de que cada ambiente possui um ótimo para determinado caráter, e a seleção de diferentes médias desse caráter nos diferentes ambientes produz uma resposta plástica. Portanto, para Via, seleção na própria plasticidade não é necessária para a evolução da plasticidade adaptativa. Uma resposta direta a esse artigo foi elaborada por (Schlichting e Pigliucci, 1993): o modelo de Via (1993) é bastante plausível para as respostas plásticas que envolvem sensibilidade alélica, mas para as respostas de limiar (que envolvem vias alternativas de desenvolvimento), genes específicos que regulam essas vias existem comprovadamente.

A discussão sobre plasticidade fenotípica e evolução envolve respostas que diferem em características importantes. Essas respostas foram categorizadas em sensibilidade alélica ou modulação fenotípica e resposta de limiar ou conversão de desenvolvimento (Smith-Gill, 1983). Assim, para entendermos o debate, as características dessas duas respostas precisam ser contrastadas. Segundo Smith-Gill (1983):

Modulação fenotípica

- É uma resposta a aspectos fisiológicos;
- Mantém a mesma via de desenvolvimento;
- Ocorre em qualquer estágio do desenvolvimento;
- Produz fenótipos contínuos;
- Pode ou não ser adaptativa.

Conversão de desenvolvimento

- É uma resposta modulada por controle genético específico;
- Ativa vias alternativas de desenvolvimento;
- Ocorre em determinados estágios do desenvolvimento;
- Produz fenótipos discretos;
- É adaptativa.

A modulação fenotípica é constituída de respostas individuais a fatores principalmente físicos devido à sensibilidade de diferentes alelos de loci gênicos a esses fatores. Os mesmos loci são expressos em todos os ambientes, sendo que sua expressão é regulada por esses fatores físicos (Schlichting e Pigliucci, 1993). Fatores esses como a temperatura, que pode regular tanto a quantidade como a atividade (no caso de enzimas) dos produtos gênicos, gerando alterações físico-químicas de elementos celulares e teciduais (Schlichting e Pigliucci, 1998). Já as respostas de conversão do desenvolvimento dependem da ativação de genes regulatórios distintos em ambientes distintos, que por sua vez regulam outros conjuntos de genes, que levam à ativação de vias alternativas de desenvolvimento. Os casos de plasticidade fenotípica que envolvem conversão de desenvolvimento são os mais estudados por serem respostas muito específicas ao ambiente e normalmente mais complexas, abarcando vários caracteres de uma vez. Entre os diversos exemplos, podemos citar: (1) a resposta à luz em angiospermas (“shade-avoidance response”) e os genes de fitocromos (receptores de luz); (2) a resposta de choque térmico (“heat-shock response”) e os genes de choque térmico (“hsp genes”- genes que expressam proteínas de choque térmico – as chaperonas); (3) a resposta à limitação de enxofre em cianobactérias e os genes de ficocianina; e (4) a determinação do sexo dependente de temperatura em répteis e a ação da temperatura na atividade das enzimas aromatase e redutase (Pigliucci, 1996). Com a descoberta desses genes de plasticidade, o debate foi resolvido. As respostas plásticas de conversão do desenvolvimento possuem base genética específica, podendo a plasticidade ser considerada um caráter sob ação da seleção natural.

As respostas de modulação fenotípica, apesar de não possuírem controle genético específico, podem permitir a permanência de uma população diante de uma

mudança ambiental, e inclusive serem um passo intermediário da evolução de uma resposta mais sofisticada, como a de conversão do desenvolvimento (Schlichting e Pigliucci, 1995). Existem teorias sobre as condições ambientais que favorecem a plasticidade e sobre os requisitos para que essa resposta surja, lidando principalmente com conversão de desenvolvimento, que são as respostas com maior chance de serem adaptativas (Smith-Gill, 1983).

Uma teoria bastante importante é a “Teoria da Aptidão em Ambientes Heterogêneos”, desenvolvida por Richard Levins (Levins, 1962; 1963). Levins utilizou uma abordagem ecológica para determinar a aptidão (medida em número médio de filhotes) de uma espécie, considerando toda sua distribuição geográfica, compreendendo que os organismos distribuem-se em ambientes nos quais os fatores ambientais variam, ou seja, nos quais há heterogeneidade/variação ambiental. A teoria é baseada na existência de frequências distintas de nichos ecológicos disponíveis para uma população e seu efeito na aptidão da mesma. Para simplificar a modelagem, Levins considerou apenas dois nichos (1 e 2), organizados em três tipos de padrões ambientais:

1. Heterogeneidade espacial – disponibilidade de dois nichos para a população, em proporções fixas ao longo das gerações;
2. Heterogeneidade temporal – disponibilidade de apenas um nicho (1 ou 2) para a população, mas em proporção variável ao longo das gerações;
3. Heterogeneidade espacial e temporal – disponibilidade de dois nichos em proporções variáveis ao longo das gerações.

Em seu artigo de 1963, Levins considerou um fenótipo influenciado pelo ambiente de acordo com um coeficiente de plasticidade, que indica a capacidade de resposta ao ambiente. Nesse novo contexto, a aptidão de um indivíduo é derivada da soma de sua homeostase fisiológica (tolerância do organismo a condições não-ótimas) e sua plasticidade de desenvolvimento. Se os indivíduos da população são viáveis em mais de um nicho, o fenótipo ótimo pode variar continuamente com o ambiente (plasticidade em forma de modulação fenotípica) ou ser específico de cada nicho, se existir mais de uma via de desenvolvimento no indivíduo (plasticidade em forma de

conversão do desenvolvimento). Se os indivíduos ou toleram um nicho ou toleram o outro, o polimorfismo genético poderá surgir.

Entretanto, apesar da heterogeneidade ambiental, existem outros requisitos para que uma resposta plástica adaptativa possa surgir e se manter (Newman, 1992):

- Existência de dicas ambientais: previsibilidade da mudança ambiental;
- Capacidade de recepção e transdução dos sinais ambientais: conversão das dicas ambientais em ativação de respostas correspondentes;
- Existência de um compromisso de aptidão em diferentes condições ambientais: um mesmo fenótipo não pode ter aptidão semelhante em diferentes condições ambientais, senão um fenótipo fixo seria favorecido;
- Ocorrência de variação genética para plasticidade: genótipos na população que possuam diferentes respostas plásticas ao mesmo ambiente;
- Seleção natural atuando na plasticidade: os caracteres plásticos devem ter uma relação com a aptidão para serem sujeitos à seleção.

A plasticidade fenotípica, portanto, pode ser a resposta mais vantajosa de um indivíduo diante de flutuações ambientais, mas existem diversas restrições, como a ausência de algum requisito acima ou mesmo a existência de custos à origem e/ou à manutenção da plasticidade (Dewitt, Sih *et al.*, 1998; Relyea, 2002). Porém, respostas plásticas são ubíquas nos organismos, assim como variações ambientais na natureza (West-Eberhard, 1989), indicando que sua interação são de alta importância para a manutenção e evolução da vida.

2. Plasticidade fenotípica e Normas de reação de desenvolvimento

Um marco teórico apropriado para se estudar plasticidade fenotípica é o conceito de normas de reação de desenvolvimento (NRD). Estas se referem a um conjunto de ontogênias ou trajetórias que podem ser produzidas por um genótipo ao ser exposto a variação ambiental interna ou externa ao organismo (Schlichting e Pigliucci, 1998). A norma de reação expressa a relação entre genótipo, ambiente e fenótipo de maneira conjunta (Lewontin, 1974). A idéia de norma de reação abarca

todas as possibilidades de respostas plásticas, incluindo plasticidade zero (ou seja, expressão de um fenótipo fixo independente de alterações do ambiente).

Uma concepção distinta de plasticidade é a de tratar a expressão de um caráter em diferentes ambientes como caracteres distintos, relacionados por correlação genética (r_{ae} = “coefficient of correlation among environments” (Via, Gomulkiewicz *et al.*, 1995). Essas correlações podem ocorrer devido à ligação gênica, pleiotropia e/ou epistasia de genes que regulam a resposta plástica. Essa abordagem foca nos mecanismos genéticos da plasticidade, sem considerar aspectos fisiológicos ou ecológicos, e é limitada para estudo em somente dois ambientes, restringindo a quantidade de variação ambiental a ser estudada.

A NRD contextualiza os caracteres dos organismos, por levar em conta a ecologia, e considera o fenômeno por meio do qual as variações fenotípicas são produzidas, o desenvolvimento. Sua concepção é especialmente importante quando notamos que a variância ambiental depende da distribuição de genótipos, e a variância genética depende da distribuição de ambientes (Lewontin, 1974). Além disso, uma NRD reflete a história natural e o potencial futuro de um genótipo (Schlichting e Pigliucci, 1998). As respostas de modulação fenotípica e conversão de desenvolvimento podem ser representadas como normas de reação contínuas e discretas, respectivamente (Figura 1).

Por meio das NRD, o estudo da plasticidade torna-se mais detalhado, sendo possível analisar atributos como magnitude e padrão da resposta plástica, através da altura e da forma da norma de reação (Schlichting e Pigliucci, 1998). Outro aspecto importante que pode ser visualizado pelas NRD é a ocorrência de canalização diante de uma faixa ampla de variação ambiental. A canalização é uma característica do sistema de desenvolvimento, mantida pela seleção natural, que limita a variação final do fenótipo diante de variações ambientais, garantindo o fenótipo ótimo (Waddington, 1942). Waddington (1960) visualizava a seleção estabilizadora (que elimina variações distantes demais do fenótipo ótimo) em duas formas: a seleção normalizadora – que tende a eliminar alelos que produzem fenótipos anormais em condições ambientais normais, e a seleção canalizadora – que tende a eliminar alelos que tornam o sistema de desenvolvimento sensível a estresses ambientais. Perante essas considerações sobre as NRD, consideramos seu uso como essencial para este estudo.

Figura 1. Tipos de respostas plásticas e normas de reação correspondentes. As duas respostas plásticas diferem em seu controle genético e em seu mecanismo de desenvolvimento. Na modulação fenotípica, os mesmos genes são expressos em todos os ambientes, mas com diferentes efeitos, gerando respostas contínuas, que são as normas de reação contínuas. A linha vermelha representa uma norma não plástica enquanto a linha preta representa uma norma plástica. Na conversão de desenvolvimento, diferentes conjuntos de genes são regulados nos diferentes ambientes, gerando respostas descontínuas, representadas pelas normas de reação de limiar. A partir de um determinado limiar do fator ambiental, uma via distinta de desenvolvimento será ativada, produzindo um fenótipo discreto. Modificado de Schlichting e Pigliucci 1995.

3. Mudanças ambientais e Normas de reação

A relação entre plasticidade e ocupação de novos ambientes data desde 1896 com as idéias de Baldwin. Seu modelo teórico prediz que respostas plásticas adaptativas de indivíduos de uma população aumentam sua chance de permanência em um novo ambiente (Baldwin, 1896). A plasticidade em alguns caracteres pode contribuir para a constância adaptativa de outros caracteres, diretamente relacionados com a aptidão, em diversas condições ambientais, permitindo a homeostase funcional em novos ambientes (Lewontin, 1957; Sultan e Bazzaz, 1993).

Alguns testes do modelo de Baldwin foram feitos, principalmente com plantas. Os trabalhos de Donohue, Pyle *et al.* (2001) e Etterson (2004) investigaram a

influência da plasticidade de populações de plantas em permanecerem em novas condições ambientais de densidade e clima, respectivamente. Ambos os autores realizaram experimentos de transplante de indivíduos das populações nativas de um ambiente para outros ambientes e caracterizaram a plasticidade por métodos de genética quantitativa, inclusive determinando valores de intensidade e direção de seleção. As perguntas centrais foram: (1) A plasticidade que evoluiu em resposta à variação ambiental dentro de um ambiente pode influenciar a expressão fenotípica em um novo ambiente? e (2) As respostas plásticas surgidas em novos ambientes são na direção dos valores fenotípicos favorecidos pela seleção? Os dois autores concluíram que as respostas a essas perguntas são afirmativas, indicando que a plasticidade pode mitigar perdas de aptidão, e assim contribuir para a colonização de novos ambientes.

Estudos com colonizações de novos ambientes por animais são menos comuns, talvez porque haja uma tradição de se estudar plasticidade fenotípica e invasões biológicas em plantas. O trabalho de Yeh e Price (2004) ilustra como a plasticidade possibilitou a permanência de uma população de aves nativas das montanhas em um ambiente de costa oceânica. Os autores detectaram um aumento da temporada de reprodução na população da costa, que foi correlacionada com a aptidão. A variação do tempo de reprodução se deu por plasticidade das fêmeas, e sem o aumento desse caráter a população começaria a diminuir em tamanho.

Estudos como os citados acima apresentam evidência forte de como a plasticidade pode permitir a permanência de uma população em novas condições ambientais. Entretanto, Richards, Bossdorf *et al.* (2006) apontaram que faltam trabalhos em um contexto comparativo mais amplo para responder a pergunta “Qual o grau de diferença na plasticidade de espécies invasoras e não-invasoras?”. Acreditamos que essa pergunta pode ser parcialmente respondida ao compararmos normas de reação de desenvolvimento de espécies com diferentes histórias naturais quanto à colonização/permanência em novas condições ambientais.

A concepção de normas de reação é muito interessante para se estudar plasticidade diante de novos ambientes, porém pouco utilizada nessa conjuntura (Lee, Remfert *et al.*, 2003; Richards, Bossdorf *et al.*, 2006). Schmalhausen (1949), em seu livro “Factors in Evolution”, levantou a idéia de que a parte efetivamente expressa de uma norma de reação depende do ambiente, mas que também existem partes de potencial expressão (refletindo a potencialidade do sistema de desenvolvimento em

gerar novos fenótipos – em Pigliucci, 2001). Uma mudança do ambiente ou uma migração do organismo para outro ambiente podem resultar em partes da norma antiga não mais expressas nem expostas à seleção, enquanto outras novas partes serão expostas, culminando em uma alteração da norma ancestral (Pigliucci, 2001). Essas idéias traduzem-se atualmente nos conceitos de “normas de reação ocultas” e “variação genética críptica” (Schlichting, 2008). Ou seja, haveria a possibilidade de partes da norma que aparecem somente em novas condições ambientais, evidenciando um potencial de desenvolvimento revelado em novas condições. A expressão de uma norma oculta refere-se à expressão de fenótipos novos, em relação aos fenótipos ancestrais, e está relacionada com condições ambientais nunca experimentadas pela aquela população ou de baixa freqüência de ocorrência naquele ambiente (Figura 2).

Figura 2. Padrões possíveis de uma norma de reação. Estão representados três padrões de resposta fenotípica em porções de uma norma de reação: norma oculta (em vermelho), norma canalizada e norma plástica. Uma parte oculta de uma norma significa uma expressão fenotípica que somente se revela em condições ambientais novas ou raras, gerando fenótipos não produzidos anteriormente, ou seja, há liberação de variação fenotípica escondida ou críptica. A parte canalizada de uma norma refere-se à porção não plástica, que não varia em seu valor fenotípico diante de variações ambientais. Estas provavelmente são variações comumente encontradas pelos indivíduos, mas as quais o organismo não é sensível. Finalmente, a norma plástica é expressa em condições frequentes porém que flutuam, originando variação no valor fenotípico conforme sua aptidão nas determinadas condições, se a plasticidade for adaptativa. Modificado de Schlichting 2008.

No contexto da pergunta se espécies mais invasoras são mais plásticas, esperamos que as invasoras sejam capazes de expressar esses novos fenótipos ao colonizarem ou permanecerem em um novo ambiente, enquanto que as espécies não-invasoras não teriam a plasticidade de sua norma de desenvolvimento suficiente para isso.

4. A caatinga como um novo ambiente e a Fauna de anfíbios anuros

O bioma brasileiro da caatinga possui características únicas: clima semi-árido com a mais alta radiação solar, a mais alta temperatura média anual, as mais baixas taxas de umidade relativa, evapotranspiração potencial mais elevada e precipitações mais baixas e irregulares, limitadas a um período muito curto do ano, geralmente dois a três meses (Reis, 1976). A ocorrência dos ciclos de chuva e seca e a precipitação altamente imprevisível também são aspectos únicos da caatinga como bioma brasileiro (Nimer, 1972). No entanto, muitas evidências sugerem que a caatinga não foi sempre assim (Bigarella e Andrade-Lima, 1982; Hartwig e Cartelle, 1996; de Vivo, 1997; Carnaval, 2001), e que seu clima atual foi resultado de um processo de aridificação iniciado a aproximadamente 10.000 anos.

Segundo vários estudos, antes da aridificação, a caatinga assemelhava-se a uma floresta úmida. Uma das evidências mais contundentes foi o achado de um fóssil de um novo gênero de macaco (*Caipora bambuiorum*) na caatinga baiana, datado do Pleistoceno tardio (cerca de 10.000 anos atrás), que foi estimado em ter um peso muito acima dos macacos recentes da mesma família. Esse macaco foi considerado como um mega-herbívoros, e os autores sugeriram que na época em que viveu, a área deveria ser uma floresta para poder sustentar um animal como esse (Hartwig e Cartelle, 1996). Outro autor que defende a origem recente da caatinga a partir de uma floresta é de Vivo (1997). Ele aponta como evidências para isso a disjunção da distribuição de populações de conspecíficos de mamíferos das florestas atlântica e amazônica (sugerindo que havia uma continuidade entre essas duas florestas por meio da caatinga) e a falta de adaptações fisiológicas da fauna de mamíferos às condições semi-áridas.

Um estudo sobre filogeografia de quatro espécies de anfíbios anuros em remanescentes de floresta (brejos) na caatinga também suporta a hipótese desse bioma ter sido uma floresta (Carnaval, 2002). A autora estudou populações da mesma espécie com distribuições separadas nos brejos da caatinga e na própria mata atlântica, e descobriu que as populações são relacionadas geneticamente. Como é muito improvável que as populações de mata tenham atravessado a caatinga para manter o fluxo gênico com as populações dos brejos, a autora sugeriu que a mata foi conectada

à caatinga em um passado recente, já que a diferenciação genética entre as populações da mesma espécie é pequena.

Considerando todas essas evidências, podemos caracterizar a caatinga como um ambiente recente, e portanto muito interessante para se estudar a manutenção de espécies representando diferentes linhagens, inclusive evidenciando adaptação às novas condições climáticas. A possibilidade da caatinga ter sido uma floresta úmida, um habitat tão diferente do regime semi-árido atual, favorece ainda mais a escolha desse bioma como um sistema de estudo. Neste contexto, muitos organismos poderiam ser estudados. Contudo, escolhemos os anfíbios anuros como modelo por diversas razões.

A fauna de anuros é bem caracterizada para a caatinga. As famílias Hylidae, Bufonidae, Microhylidae, Phyllomedusidae, Pipidae e Leptodactylinae (subfamília da antiga Leptodactylidae Lynch, 1971), possuem representantes nesse habitat, mas apenas as duas primeiras são diversas, com mais de 15 espécies, sendo as demais famílias representadas por apenas duas espécies. Um aspecto extremamente relevante é que não há anuros endêmicos na caatinga (Trefaut-Rodrigues, 2003). Talvez a única exceção seja a espécie *Corythomantis greeningi*, um hílideo que possui co-ossificação do crânio e se esconde em buracos em árvores (Jared, Antoniazzi *et al.*, 2005).

Além disso, algumas características climáticas da caatinga pareceram-nos adversas dada sua sazonalidade na disponibilidade de água e suas altas temperaturas, particularmente nos sítios de reprodução das espécies de anuros. Parece-nos, portanto, que a aridificação que ocorreu na região da caatinga reduziu drasticamente a diversidade de anuros. Porém, algumas espécies continuam lá, e a sua presença leva a perguntas sobre quais mecanismos permitiram essas espécies a se manterem nesse novo ambiente.

5. Plasticidade fenotípica em larvas de anfíbios anuros

Respostas como polimorfismo genético, seleção de microhabitats e plasticidade fenotípica podem contribuir para as populações lidarem com a heterogeneidade ambiental (Van Buskirk, Mccollum *et al.*, 1997). Considerando como objeto de estudo as larvas dos anfíbios anuros, supusemos que as respostas de plasticidade de desenvolvimento seriam mais relevantes para a sobrevivência na caatinga que as demais respostas citadas acima. Respostas como seleção de microhabitats ou estivação parecem relevantes para os adultos de anuros. Essas estratégias foram reportadas para

algumas espécies que habitam a caatinga, como *Corythomantis greeningii*, que seleciona microhabitats protegidos e úmidos (Jared, Antoniazzi *et al.*, 1999), e *Pleurodema diplolistris*, que permanece enterrado em areia ao longo da seca (Pereira, 2009). No entanto, é bastante improvável que as larvas de anuros da caatinga tenham uma amplitude grande de escolha de microhabitats nas poças em que habitam (muitas vezes pequenas e rasas), e uma estratégia como a estivação ocorre somente em fases após a metamorfose.

A hipótese de polimorfismo genético poderia ser importante na caatinga, mas somente se a tolerância a fatores ambientais de uma parcela da população de larvas fosse distinta do resto (Levins, 1963). Essa resposta resultaria em variantes genéticas específicos para determinados ambientes, já que nesses casos um alelo é favorecido em um ambiente enquanto outro alelo é favorecido em outro ambiente (Falconer e Mackay, 1996). Contudo, não há uma razão forte para supormos que a tolerância seria diferente entre partes da população de larvas de uma espécie, uma vez que a sazonalidade de chuvas da caatinga favorece o uso de microhabitats temporários por todos os indivíduos.

Larvas de anfíbios anuros são muito estudadas quanto à plasticidade fenotípica. Existem diversos modelos na literatura criados para explicar a variabilidade no tempo de desenvolvimento e no tamanho ou massa na metamorfose nesses organismos (por exemplo, Wilbur e Collins, 1973; Smith-Gill e Berven, 1979; Werner, 1986). O modelo de Wilbur e Collins (1973) prediz que o tempo de desenvolvimento é regulado pela taxa de crescimento e por pressões ecológicas. Os autores trabalharam com *Rana sylvatica* e níveis de alimentação ou densidade, e notaram que os recém-metamorfoseados possuíam uma faixa limitada de massa em comparação com as larvas. Eles propuseram que existiam um limite mínimo (denominado “b”) para a massa na metamorfose, imposto evolutivamente pela pequena sobrevivência de metamorfos de pouca massa, e um limite máximo (denominado “b + c”), imposto pelo risco de morte apresentado no habitat aquático. Segundo Wilbur e Collins, a larva continua a crescer se sua história recente de crescimento é maior que um determinado limiar de taxa de crescimento (denominada “g”). Posteriormente, Werner (1986) expandiu o modelo de Wilbur e Collins ao verificar que o potencial de crescimento na fase terrestre influencia a seleção da massa na metamorfose. Um exemplo dado foi de *Rhinella (Bufo) marina*, na qual 99,9% do crescimento total ocorre na fase terrestre.

Werner considerou que o tamanho ótimo na metamorfose depende da taxa de crescimento e da mortalidade no habitat aquático e no habitat terrestre, determinando assim um compromisso entre taxa de crescimento e risco de mortalidade. O tempo ótimo de desenvolvimento ocorreria quando o compromisso fosse o menor nos dois habitats.

O modelo de Smith-Gill e Berven (1979) foi o primeiro em destacar a relevância da taxa de diferenciação na determinação do tempo até a metamorfose e da massa na metamorfose. Esse modelo possui um caráter mais fisiológico diante dos outros dois modelos citados, que são mais ecológicos, por acessar as sensibilidades térmicas dos fenômenos do desenvolvimento. Smith-Gill e Berven construíram normas de reação para as taxas de crescimento e diferenciação em três espécies de *Rana*, diante de quatro temperaturas. Essas normas são denominadas normas de reação térmicas, e seus coeficientes angulares correspondem à sensibilidade térmica das espécies em fenômenos do desenvolvimento. Quanto mais inclinada a norma térmica, maior a sensibilidade à temperatura, pois o fenótipo se altera mais com a temperatura. Os autores verificaram que a sensibilidade térmica das taxas de crescimento é menor que a sensibilidade da diferenciação, indicando que a temperatura altera mais a diferenciação das larvas de *Rana* que o crescimento. Essa regra de sensibilidade resulta em menor massa na metamorfose em maiores temperaturas, pois a diferenciação é mais acelerada que o crescimento, gerando metamorfos de idades precoces e massa menor.

O modelo de Wilbur e Collins (1973) foi testado e confirmado empiricamente por alguns autores (por exemplo, Morey e Reznick, 2000). A expansão de Werner (1986), junto das considerações dos argumentos de Smith-Gill e Berven (1979), foram utilizados para a inclusão de outros parâmetros considerados importantes na ecologia e fisiologia das larvas de anfíbios anuros, como a possibilidade de fixação do tempo de desenvolvimento (Hensley, 1993; Hentschel, 1999) e de taxas de mortalidade que variam com o tempo (por exemplo, Rudolf e Rödel, 2007). Apesar das diferenças entre os diversos modelos, todos os estudos apontam para uma alta plasticidade das larvas de anfíbios anuros. Diante disso, e das considerações sobre os estudos que confirmaram a ação da plasticidade na colonização de novos ambientes, hipotetizamos que as larvas das espécies que se mantêm na caatinga possuem alta plasticidade de desenvolvimento em comparação com larvas de espécies que não se mantiveram nessa bioma.

6. Abordagem comparativa de normas de reação

Uma das maneiras de se determinar se as larvas dos anuros da caatinga possuem alta plasticidade fenotípica de desenvolvimento é por comparação com anuros de outros biomas, para se ter uma referência. Nós escolhemos o bioma da floresta atlântica como o comparativo por três razões principais: (1) Suas características climáticas atuais devem ser próximas de como era a caatinga antes da aridificação, (2) Seu padrão de heterogeneidade ambiental remete à heterogeneidade anterior da caatinga e (3) Existe sobreposição de gêneros de anuros na floresta atlântica e na caatinga, permitindo uma melhor separação entre os fatores filogenia e ecologia (Harvey, 1996). A situação ideal para a nossa hipótese seria comparar a plasticidade da população de larvas de anuros antes, durante e depois do processo de aridificação, mas essa condição é impraticável. A abordagem comparativa de espécies de um bioma similar às condições prévias da caatinga, como a floresta atlântica, e da própria caatinga atual, é uma opção viável e interessante.

Estudos comparativos de plasticidade e normas de reação em larvas de anfíbios anuros foram bastante raros até a década de 90. Mais recentemente, o interesse pela evolução de normas de reação em anuros culminou no aumento de trabalhos com várias espécies e no uso de estatística filogenética para análise dos dados em alguns estudos (Blouin, 1992; Morand, Joly *et al.*, 1997; Morey e Reznick, 2000; Buchholz e Hayes, 2002; Van Buskirk, 2002; Morey e Reznick, 2004; Gomez-Mestre e Buchholz, 2006). Com esses estudos, as respostas clássicas de plasticidade em larvas de anuros puderam ser testadas em um contexto evolutivo, indicando a permissividade da relação entre mudanças na variação de fatores ambientais e de plasticidade das espécies, além de se determinar o quanto a evolução da plasticidade é restringida por inércia filogenética.

Os trabalhos de Morey e Reznick (2000, 2004) são ótimos exemplos da abordagem comparativa de normas de reação em larvas de três espécies de *Scaphiopus*, que diferem em seu grau de efemeridade de seus habitats aquáticos. Os autores concluíram que as três espécies possuem normas de reação no período larval muito similares, quando as larvas foram expostas a oito níveis de alimentação. Esse resultado era esperado, uma vez que as três espécies possuem alto parentesco filogenético. Contudo, a parte da norma do período larval expressa pela espécie de

habitat mais efêmero na natureza, *S. couchii*, foi distinta das demais espécies. A parte da norma de *S. couchii* expressa em seu ambiente natural é a porção invariável no período larval, portanto essa espécie não apresenta plasticidade de desenvolvimento em condições naturais de alimentação, sendo o período larval sempre curto, condizente com um habitat que permanece por pouco tempo (Morey e Reznick, 2004). Porém, *S. couchii* não perdeu o potencial de desenvolvimento (expresso como a parte “oculta” na natureza da norma de reação) de expressar uma norma similar às outras espécies que habitam ambientes diferentes.

Os achados de Morey e Reznick (2000, 2004) foram expandidos por Buchholz e Hayes (2002), que estudaram dez espécies aparentadas filogeneticamente de quatro gêneros: *Pelobates* e *Pelodytes*, do velho mundo, e *Scaphiopus* e *Spea*, do novo mundo. Buchholz e Hayes (2002) construíram normas de reação de período larval e tamanho na metamorfose diante de três temperaturas, que representaram a variação na média dos habitats naturais das espécies estudadas. As taxas de desenvolvimento foram diferentes para as espécies do velho e novo mundo, mais rápidas nas últimas, enquanto que as taxas de crescimento foram mais similares entre todas as espécies. Os autores sugeriram que os períodos larvais curtos em *Scaphiopus* e *Spea* evoluíram após a divergência de *Pelobates* e *Pelodytes* em resposta ao aumento da efemeridade dos sítios de reprodução dessas espécies, ao longo da desertificação de seu habitat. Esse trabalho, em especial, mostra como a abordagem comparativa de normas de reação pode esclarecer a evolução de plasticidade de um grupo diante de mudanças ambientais.

7. O fator temperatura na caatinga e

Normas de reação térmicas em larvas de anuros

O processo de aridificação da caatinga é um fenômeno relacionado com a gradual redução da pluviosidade e com sua irregularidade sazonal (Nimer, 1972). Porém, apesar da mudança no fator pluviosidade ser primordial na transição para uma maior aridez, outros fatores também mudaram concomitantemente. No caso da temperatura, a vegetação mais aberta característica de regiões semi-áridas, permite uma maior incidência de radiação solar, aumentando a temperatura média do ar. As temperaturas da caatinga estão entre as mais altas do país (Reis, 1976), sendo por

consequente um fator que representa a mudança ambiental que ocorreu e que ainda ocorre nessa região.

A temperatura do corpo é um dos fatores ambientais mais influentes para animais ectotermos devido à sua interferência em taxas enzimáticas e bioquímicas (Hochachka e Somero, 2002). Além desse efeito direto nos processos bioquímicos, a temperatura também afeta padrões de atividade – tipo e duração (Bellis, 1962) e conseqüentemente a taxa na qual energia e nutrientes podem ser obtidos e assimilados (Berven, 1982). Pelos efeitos importantes da temperatura sobre o desempenho comportamental, fisiológico e ecológico, muitos estudos com anfíbios anuros correlacionam a variação térmica com medidas de sobrevivência e aptidão. Esses estudos salientam parâmetros fisiológicos com clara relevância ecológica, como curvas de desempenho comportamental (Huey e Stevenson, 1979; Berven, 1982; Navas, 1996), mas também parâmetros clássicos da fisiologia térmica, como tolerância térmica (Brattstrom, 1968; Sherman, 1980; Floyd, 1982). Finalmente, a relação da temperatura com a variação na plasticidade, especialmente nas larvas, também culminou em muitos trabalhos (por exemplo, Smith-Gill e Berven, 1979; Newman, 1989; 1998; Morey e Reznick, 2000; Alvarez e Niecieza, 2002; Buchholz e Hayes, 2002; Olsson e Uller, 2002; Niehaus, Wilson *et al.*, 2006).

As tolerâncias térmicas mínima e máxima de uma espécie podem ser avaliadas pelos parâmetros denominados temperatura crítica mínima e máxima (TCMin e TCMax, respectivamente). Esses parâmetros, em teoria, representam as temperaturas corpóreas nas quais os indivíduos não conseguem mais desempenhar atividades ecológicas (Huey e Stevenson, 1979; Figura 3), e podem ser medidos com referência ao controle motor ou à sobrevivência (Lowe e Vance, 1955).

Bayard H. Brattstrom (1968) mostrou que esses parâmetros estão relacionados com a distribuição geográfica de várias espécies de anuros. Brattstrom descreveu que anuros tropicais não toleram temperaturas baixas, como entre 5°C e 15°C e que as espécies habitantes de maior latitude são mais tolerantes ao frio. Navas, Antoniazzi *et al.* (2007) verificaram que os juvenis de *Rhinella granulosa*, anuro presente na caatinga, toleram até 44°C, a TCMax mais alta relatada para o gênero. Esses trabalhos mostram que as espécies de anuros são capazes de ajustar evolutivamente suas tolerâncias térmicas em relação ao ambiente em que habitam.

Figura 3. Curva de desempenho e faixa de tolerância térmica. O esquema mostra onde se inserem os parâmetros temperatura crítica máxima e mínima na curva de desempenho. Os limites térmicos determinam a faixa de tolerância, fora da qual o desempenho dos indivíduos é seriamente comprometido. Também está apresentada a temperatura ótima, na qual o desempenho é máximo. Modificado de Huey e Stevenson 1979.

Entretanto, o processo plástico de aclimação também pode contribuir para o aumento da tolerância térmica. A aclimação corresponde a uma mudança contínua na organização fisiológica em resposta direta a variações de temperatura (Hutchison, 1961). O processo de aclimação faz parte de um exemplo clássico de resposta plástica do tipo conversão de desenvolvimento, que se manifesta em espécies de todos os reinos (Pigliucci, 1996). Os indivíduos, após permanecerem um certo período de tempo em temperaturas mais elevadas, aclimatando-se, toleram por mais tempo ou toleram temperaturas mais elevadas que antes de se aclimatar (Loeschcke, Krebs *et al.*, 1994). Em invertebrados e plantas, a base molecular e genética para essa resposta plástica é bem conhecida: o aumento da expressão das proteínas denominadas chaperonas ('heat-shock proteins' ou hsp). As chaperonas interagem com outras proteínas minimizando a probabilidade destas realizarem interações inapropriadas com as demais proteínas. Elas reconhecem conformações não-nativas de proteínas e podem ajustar sua conformação ou marcá-las para degradação (Feder e Hofmann, 1999).

Além da resposta de conversão de desenvolvimento da aclimação, a temperatura pode suscitar respostas de modulação fenotípica, através de seus efeitos na sensibilidade térmica do aparato celular envolvido com o desenvolvimento das larvas. O trabalho de Smith-Gill e Berven (1979), já citado anteriormente, foi um dos

pioneiros em determinar a sensibilidade térmica das taxas de crescimento e diferenciação. Em outros trabalhos, Berven mostrou que a sensibilidade térmica do desenvolvimento pode evoluir, tornando-se mais baixas em populações de *R. clamitans* da montanha que das terras baixas (Berven, Gill *et al.*, 1979); e que as populações de montanha de *R. sylvatica* apresentam adaptações a esse ambiente, como maior tamanho de ovos e ninhos (Berven, 1981; Berven, 1982).

Apesar da grande quantidade de estudos com larvas de anuros e temperatura, o efeito da variação da temperatura, além do efeito da média, é pouco esclarecido. Recentemente, foi realizado um estudo direcionado a identificar diferenças no crescimento, desenvolvimento, e no desempenho locomotor em *Limnodynastes peronii*, diante de um regime térmico com flutuações diurnas (atingindo temperaturas mais elevadas) e outro constante, mas de igual média. As larvas do regime variável cresceram mais, tiveram menor período larval e menor massa. Os autores destacaram que a variação térmica causou os mesmos efeitos de altas temperaturas constantes (Niehaus, Wilson *et al.*, 2006).

Considerando os microhabitats nos quais as larvas de anuros desenvolvem-se na caatinga, supusemos que tanto os valores de média e moda de temperatura seriam importantes e representativos da mudança ambiental nesse bioma, quanto os valores de variação térmica. As poças temporárias devem ser mais utilizadas na caatinga que na floresta atlântica, pois as primeiras chuvas na caatinga originam somente esse tipo de microhabitat, que é amplamente utilizado para reprodução por praticamente todas as espécies de anuros (observações pessoais). Hipotetizamos que esse tipo de microhabitat, poças temporárias, deveria ter alta variação de temperatura ao longo do dia, em comparação com os corpos de água permanentes encontrados comumente na floresta atlântica. Desse modo, a variação da temperatura seria um fator tão relevante quanto a tendência central da mesma de ser estudado na comparação da plasticidade fenotípica das larvas dos dois biomas. Escolhemos o gênero *Rhinella* como objeto de estudo, pois sua distribuição é muito ampla, abrangendo todos os biomas do Brasil (Duellman e Sweet, 1999), e sua fisiologia térmica é bastante versátil (Brattstrom, 1962; Navas, 2002). Além disso, o uso de diversos tipos de corpos de água pelas espécies, incluindo poças temporárias (Heyer, 1990), torna o gênero um bom candidato a exibir ajustes de caráter fisiológico ao longo de gradientes ambientais.

Objetivos

1. Objetivo geral

Diante de todo o exposto acima, tivemos como objetivo comparar a plasticidade fenotípica de parâmetros relevantes na sobrevivência e no desenvolvimento das larvas das espécies *Rhinella ornata* e *Rhinella icterica*, presentes na floresta atlântica, e *Rhinella granulosa*, presente na caatinga, por meio da abordagem de normas de reação térmicas. Como hipótese geral propusemos que *R. granulosa* é mais plástica nesses parâmetros que *R. ornata* e *R. icterica*.

2. Objetivos específicos

- Caracterizar a variação ambiental dos locais de estudo quanto ao clima geral e quanto à variação de fatores ambientais dos microhabitats larvais;
- Descrever a variação natural de plasticidade na massa estágio-específica das espécies em estudo;
- Analisar a sobrevivência e a plasticidade da massa na metamorfose das espécies em experimentos de campo;
- Comparar as normas de reação bivariadas (relações entre variáveis dependentes) e as normas de reação de variação térmica (quanto aos parâmetros de desenvolvimento) das espécies *R. ornata* e *R. icterica*;
- Comparar as normas de reação de tolerância térmica das larvas das três espécies.

Materiais e Métodos

1. Locais de estudo

As coletas de cordões de ovos e os estudos de campo foram realizados na Fazenda São Miguel (5° 39' 43''S, 36° 36' 18''W), uma propriedade privada perto da cidade de Angicos, no Rio Grande do Norte, e na Estação Biológica de Boracéia (EBB 28° 38'S, 45° 52'W – administrada pelo Museu de Zoologia da USP), no litoral do estado de São Paulo (Figura 4). A região de Angicos insere-se no bioma da caatinga e apresenta clima quente e semi-árido, do tipo tropical da zona equatorial, com temperatura média anual de 26°C e pluviosidade anual de 750 mm, concentrada nos meses de março a maio (Nimer, 1972). Angicos é um local bem amostrado quanto à herpetofauna, havendo aproximadamente oito espécies de anfíbios anuros, das famílias Hylidae, Leptodactylinae, Bufonidae, Phyllomedusidae e Pipidae (Trefaut-Rodrigues, 2003).

A EBBoracéia localiza-se a 80 km da cidade de São Paulo, a uma altitude aproximada de 900 m do nível do mar. A região é uma das mais chuvosas do Brasil, com média anual nos anos entre 1925 e 1944 de 3058 mm. A vegetação é típica de floresta atlântica, com abundância de palmeiras (principalmente *Euterpe edulis*), bromélias e bambus. A fauna de anuros é de pelo menos 66 espécies pertencentes a seis famílias, e existem muitos gêneros, particularmente da sub-família Leptodactylinae, endêmicos da Floresta Atlântica (Bertoluci e Rodrigues, 2002). De 183 espécies de floresta descritas no sudeste brasileiro, 168 (92%) são endêmicas ao domínio atlântico (Lynch, 1979). Muitos estudos foram e são realizados nessa estação sobre anfíbios anuros, como o de descrição da fauna no livro de Heyer (1988) e o de padrões de canto de várias espécies no artigo de Bertoluci e Rodrigues (2002).

2. Espécies

Três espécies de *Rhinella* foram estudadas: *R. ornata* e *R. icterica*, da floresta atlântica, e *R. granulosa*, da caatinga (Figura 5). Esse gênero pertence à família Bufonidae, que possui em torno de 35 gêneros e 481 espécies (Pramuk, Robertson *et al.*, 2008). No artigo de (Frost, Grant *et al.*, 2006), o gênero *Bufo* foi repartido em 17

gêneros distintos, considerados monofiléticos, para resolver sua polifilia e parafilia. Entre esses gêneros, estava *Rhinella*, para o grupo de *B. magaritifera*, e o gênero *Chaunus*, com a espécie-tipo de *B. granulatus*. Segundo Frost e col. (2006), as espécies que nós estudamos pertenciam ao gênero *Chaunus*. Entretanto, com o artigo de (Chaparro, Pramuk *et al.*, 2007), todas as espécies do gênero *Chaunus* foram mudadas para o gênero *Rhinella*. Apesar das mudanças de nomenclatura, as relações filogenéticas entre as espécies estudadas continuaram as mesmas de quando ainda eram do gênero *Bufo*.

A espécie *R. ornata* foi revalidada, ainda como *B. ornata*, na revisão de 2004 de Baldissera, Caramaschi *et al.*, após ter sido considerada uma sub-espécie de *B. crucifer*. Sua distribuição abrange o sudeste do ES, RJ e SP, até o nordeste do PR. Os adultos de *R. ornata* habitam diversos tipos de habitats terrestres: floresta primária e secundária, clareiras e pastos, e estão sempre associados ao ambiente florestal (Heyer, 1990). A reprodução de *R. ornata* é explosiva e restrita ao início (junho- julho) e ao fim (outubro – novembro) da estação chuvosa (Bertoluci e Rodrigues, 2002).

R. icterica pertence ao grupo de *R. marina* e possui ampla distribuição geográfica, abrangendo Brasil, Paraguai e Argentina (Pramuk, 2006). Como *R. ornata*, ocupa diferentes tipos de habitats: florestais, clareiras, bancos de areia e até mesmo imediações de estradas, quando vai reproduzir. Essa espécie possui reprodução ao longo de diversos meses, concentrada em agosto a dezembro, e não-explosiva (Bertoluci e Rodrigues, 2002).

Recentemente, Narvaes e Rodrigues (2009) publicaram uma revisão taxonômica do grupo de *R. granulosa*, que possui doze espécies. A identificação das espécies foi por comparações da morfologia externa e de dados morfométricos. Todas as espécies são associadas a habitats abertos da América do Sul e Panamá, sendo que no Brasil ocupam os domínios da caatinga, do cerrado e de restinga. *R. granulosa* ocorre predominantemente na caatinga, nos estados de MG, BA, ES, AL, CE, PB, PE, PI, RN e SE. Assim como *R. ornata*, também possui reprodução explosiva associada a chuvas mais fortes, no entanto, a quantidade de indivíduos reproduzindo por vez é muito maior em *R. granulosa* (observação pessoal).

As três espécies são muito próximas filogeneticamente, sendo que os grupos de *R. marina* (o qual pertence *R. icterica*) + *R. crucifer* (o qual pertence *R. ornata*) é considerado como grupo-irmão de *R. granulosa* (Pramuk, 2006; Chaparro, Pramuk *et*

al., 2007; Pramuk, Robertson *et al.*, 2008). Essas relações de parentesco são consideradas bastante confiáveis, uma vez que as filogenias foram construídas com dados morfológicos combinados com dados moleculares.

Figura 4. Mapa do Brasil de biomas e as regiões de estudo. As coletas e estudos de campo foram realizados nos marcos em vermelho no mapa: Angicos, RN – bioma da caatinga e São Paulo, SP – bioma da mata atlântica. Mapa modificado do site do IBGE.

Figura 5. Espécies estudadas e suas larvas. A) *Rhinella granulosa* - caatinga. B) *Rhinella ornata* – mata atlântica. C) *Rhinella icterica* – mata atlântica. D) Larvas das três espécies. Note como as larvas de *R. ornata* e *R. icterica* são indistinguíveis.

3. Coleta de dados climáticos em campo

Para a caracterização do clima específico dos locais de estudo, instalamos micro-estações climáticas (Onset Computer Corporations, MA – USA Figura 6) em São Miguel (RN) e em Boracéia (SP), nos dias 09 de fevereiro e 01 de março de 2009, respectivamente. Em cada local, os dados foram coletados por cerca de 1 ano. Cada micro-estação possui sensores para pluviosidade, radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar. Os dados foram coletados a cada 10 minutos para cada variável e registrados em um carregador de dados. Criamos os gráficos de variação climática com o uso da interface HOBOWarePro.

Figura 6. Fotos das micro-estações climáticas em São Miguel – RN (A) e em Boracéia – SP (B). As estações possuem sensores de pluviosidade, umidade relativa do ar, temperatura e radiação solar. Os dados foram registrados a cada 30 minutos para todos esses parâmetros, em São Miguel, na caatinga, e em Boracéia, na mata atlântica.

4. Caracterização dos microhabitats larvais

Os microhabitats onde se encontraram larvas de *Rhinella* foram caracterizados quanto à temperatura e ao pH. Essas medidas foram feitas nos meses de novembro e dezembro de 2007 na EBB, e em março e abril de 2008 e março de 2009 em S. Miguel, seguindo a fase de chuvas dos locais. Medimos a temperatura em intervalos de

uma hora com registradores de dados de 1,0°C de precisão (*ibuttons* – Maxim), protegidos da água com luvas de borracha. Os *ibuttons* foram posicionados no fundo dos corpos de água. A coleta dos dados de temperatura durou em torno de trinta dias nos microhabitats da EEB, 20 dias nos microhabitats maiores de S. Miguel e oito dias nos menores e mais efêmeros (poças nas rochas ou na vegetação).

As medidas de pH foram feitas com um analisador bioquímico (HACH) em intervalos de 3 horas, das 6:00 às 18:00. As medidas destes parâmetros foram sempre associadas a uma área onde havia um *ibutton* e os eletrodos foram posicionados na mesma profundidade que os registradores quando possível (em casos de grande profundidade, o eletrodo ficou acima do registrador), na maioria das vezes correspondendo à profundidade máxima do microhabitat. Cada microhabitat foi amostrado no mínimo 3 dias, com exceção do microhabitat ‘Pedreira’ de Boracéia, que foi amostrado somente um dia, devido à falta de gel de KCl para medir o pH na ocasião. Apresentamos os dados como média diária e variação diária média.

Além dessas medidas, a maioria dos microhabitats foi descrita quanto ao tipo de substrato, à exposição ao sol e quanto ao tamanho e profundidade máxima. Em relação aos fatores bióticos, somente se identificou outros gêneros de anuros coexistindo nos mesmos microhabitats de *Rhinella*, e a ocorrência de potenciais predadores das larvas.

5. Distribuição natural da massa estágio-específica

Com a finalidade de se descrever o peso das larvas em relação aos estágios em condições naturais, coletamos 5 amostras de 15 indivíduos de diferentes microhabitats, em intervalos de dois dias. A coleta sequencial foi feita para aumentarmos a extensão de estágios amostrados. As coletas foram em novembro e dezembro de 2007 para as larvas de Boracéia e em março de 2008 para as larvas de S. Miguel.

Pesamos as larvas com uma balança de precisão 0,01 g, e determinamos o estágio de desenvolvimento com o uso de uma tabela de identificação (Gosner, 1960), na qual os estágios foram determinados por marcos morfológicos externos. Essa tabela foi adequada para se determinar os estágios, já que foi construída com o mesmo gênero que o estudado no projeto (antigo *Bufo*). Para se realizar as medições, os

girinos foram anestesiados com uma solução de uretana a 3 g/L, e os indivíduos foram levemente secos em papel toalha (para retirar o excesso de água) para a determinação do peso. Para identificar os estágios, usou-se uma lupa. Ao final, as larvas foram fixadas em formol 10%.

Em Boracéia, não foi possível diferenciar as espécies *R. ornata* e *R. icterica*. As distribuições de massa estágio-específica são para o gênero, portanto. Em S. Miguel, a identificação de *R. granulosa* foi possível, pelas larvas serem claramente distinguíveis de outras espécies presentes no mesmo microhabitat.

6. Experimentos de campo

Os experimentos de campo foram executados para a análise de variáveis do desenvolvimento nas condições as mais próximas possíveis das naturais. A fim de se acompanhar o desenvolvimento das mesmas larvas de uma mesma desova, optamos por utilizar gaiolas dispostas em diferentes microhabitats. As gaiolas foram construídas com bacias plásticas, abertas lateralmente e sem o fundo, recobertas com tela (Figura 7A).

6.1. *Rhinella ornata* e *Rhinella icterica*

Em Boracéia, conduzimos os experimentos nos meses de setembro a dezembro de 2008. Quando uma desova era encontrada, marcávamos o local, e no dia em que as larvas atingiam o estágio 26 (primeiro estágio larval, reconhecível por ser quando as larvas internalizam as brânquias), os indivíduos eram coletados e aleatoriamente (por sorteio) distribuídos em gaiolas distintas, até o total de 30 indivíduos por gaiola. Em seguida, as gaiolas eram sorteadas em microhabitats sabidamente diferentes (pelo monitoramento da temperatura no ano anterior), sendo que uma das gaiolas sempre ficava no local onde a desova foi encontrada. Como o intuito foi dispor as gaiolas em microhabitats os mais distintos possíveis, desovas encontradas na ‘Pedreira’ eram distribuídas em gaiolas localizadas na própria ‘Pedreira’ e outras gaiolas eram translocadas à ‘Cachoeira’. No caso da desova ter sido encontrada na ‘Cachoeira’, procedíamos da mesma maneira, portanto algumas gaiolas eram translocadas à ‘Pedreira’. Antes de fechar as gaiolas, colocávamos um medidor de temperatura

(registro de hora em hora) em cada uma e uma grande quantidade de alga para alimentação das larvas.

As larvas eram monitoradas em cada gaiola semanalmente. Após a abertura das gaiolas, as larvas eram postas em sacos plásticos e levadas ao laboratório da EBB. Lá, 10 larvas por gaiola eram sorteadas para serem analisadas. Cada indivíduo era colocado em um mini-aquário (construído com lâminas de microscopia e com uma escala de 1,0 mm ao fundo – Figura 7B) e sua foto era tirada. Esse procedimento foi adotado para minimizar o tempo em que a larva era mantida fora da água. As fotos foram analisadas com o software ImageJ para a identificação dos estágios, já que era possível aumentar o tamanho da imagem sem distorcê-la, e verificar os caracteres morfológicos marcantes, como indicado na tabela de identificação de Gosner (1960).

Figura 7. Fotos representativas da gaiola (A) e do mini-aquário (B) utilizados nos experimentos de campo.

A) As gaiolas foram confeccionadas com o uso de cestos de plástico com aberturas laterais e sem fundo, recobertas por uma tela. Periodicamente, as gaiolas eram abertas e as larvas coletadas para serem pesadas e estagiadas. **B)** Mini-aquário construído com lâminas de microscópio e borrachas de paredes. As fotos eram tiradas nesse aparato, permanecendo as larvas em posição lateral e em água.

Em seguida as larvas eram pesadas em balança de 0,01 g de precisão, após serem rapidamente secas em papel toalha. Ao final, contávamos o número de larvas remanescentes em cada gaiola, para a posterior criação de curvas de sobrevivência pelo tempo. Terminadas as medições, descarregávamos os dados de temperatura de cada gaiola e as larvas eram recolocadas nos sacos plásticos e devolvidas à sua gaiola de origem. Esse procedimento era repetido a cada semana até a maioria das larvas atingir os estágios 41/42, que representam o final do desenvolvimento larval.

Os metamorfos sobreviventes de cada gaiola foram levados ao laboratório e criados com alimentação de drosófilas até crescerem o suficiente para serem identificados. Com tamanhos de aproximadamente 1,0 cm, os juvenis de *R. ornata* já são distinguíveis dos juvenis de *R. icterica*, pelo formato do corpo, tamanho dos membros posteriores e padrão de manchas no dorso.

6.2. *Rhinella granulosa*

No dia 12 de março de 2009, coletamos 20 casais em amplexo de *R. granulosa* em sacos plásticos contendo um pouco de água. Os machos foram facilmente localizados, através de seus cantos, e estavam em poças próximas de ou no meio do açude. Coletamos parte dos casais de madrugada, com auxílio de lanternas, e parte no início da manhã (por volta de 06:00), quando a visibilidade foi bem maior, facilitando a coleta. Após o transporte para a casa de campo, cada casal foi numerado e colocado em uma bacia plástica (de 5L ou 20L) com aproximadamente 10 cm de água do açude e um carregador de dados de temperatura medindo a cada 30 minutos. Os adultos da espécie *R. granulosa*, por terem um tamanho rostro-anal médio relativamente pequeno (aproximadamente 10 cm) e por apresentarem reprodução explosiva, são ideais para a coleta de amplexos e desova em condições semi-naturais.

Nesse mesmo dia, dezoito casais desovaram cordões de ovos nas bacias (Figuras 8A e 8B). Os cordões, o macho e a fêmea de cada casal foram pesados, para a posterior verificação de relações entre essas variáveis. O macho é claramente distinguível da fêmea por possuir cor amarelada na região do saco vocal. Dois dos cordões de ovos foram descartados por estarem muito aquosos e portanto inapropriados para serem pesados.

Após cinco dias de desenvolvimento, os embriões já haviam se tornado larvas, nos estágios 25-26 (Figuras 8C e 8D), segundo a tabela de Gosner (1960), com as brânquias externas atrofiadas e o opérculo fechado. Nessa fase, mais seis cordões de ovos foram descartados por não apresentarem desenvolvimento adequado dos embriões. Como a maioria dos cordões inviáveis estava nas bacias menores, especulamos que o fator espaço seja relevante para o sucesso do desenvolvimento das larvas em condições semi-artificiais. O experimento estava programado para ter início quando as larvas atingissem o estágio 26, mas como as larvas ainda estavam muito pequenas e frágeis para a manipulação, o experimento teve início após sete dias de desenvolvimento. Nos dois dias anteriores ao início, foram ofertados 20 g de alface/dia, para que as larvas crescessem o suficiente para o início das manipulações.

Não sendo possível encontrar e manter nove poças temporárias naturais, optamos por simulá-las com o uso de recipientes de plástico alocados em buracos de 5 cm de profundidade na terra (Figura 9). Cada recipiente possuiu dois buracos a essa mesma altura para evitar que se enchessem além desse nível com eventuais chuvas. Trinta larvas de cada família foram sorteadas para serem postas em gaiolas e distribuídas aleatoriamente em uma das poças artificialmente construídas. Três famílias por dia foram distribuídas nos microhabitats semi-naturais, sendo que as três últimas e as três primeiras famílias possuíram dois dias de diferença no desenvolvimento. Diariamente, o nível de água era conferido e completado quando necessário com água de chuva provinda de cisternas. Cada gaiola foi suprida com 20 g de alface fervido. As poças temporárias foram os microhabitats de maior variação térmica e de altas temperaturas, sendo muito interessantes de serem estudados em campo.

Após a distribuição das gaiolas, a cada dois dias de intervalo, as gaiolas eram abertas, as larvas sobreviventes coletadas, contabilizadas, e trazidas à casa de campo para serem fotografadas e pesadas individualmente, com o mesmo procedimento que as larvas de *R. ornata* e *R. icterica*. A cada dia, os dados de três famílias eram coletados, e as larvas permaneceram fora de seus microhabitats por aproximadamente 4 horas enquanto as manipulações eram feitas.

Finalizada as manipulações, as larvas eram devolvidas às suas gaiolas em seus microhabitats iniciais, adicionadas de 20 g de alface fervido. Esse procedimento foi repetido até que o último grupo de larvas atingisse o último estágio larval (Gosner 42,

quando os membros anteriores surgem) ou até a morte total das larvas em alguns casos.

Figura 8. Fotos representativas das fases reprodutivas e de desenvolvimento de *Rhinella granulosa*. A) Casal de *R. granulosa* coletado em amplexo; **B)** Casal desovando um cordão de ovos; **C)** Embriões de *R. granulosa* nos estágios Gosner 20-21, após 2 dias de desenvolvimento; **D)** Larvas de *R. granulosa* nos estágios Gosner 25-26, após 5 dias de desenvolvimento. O objeto branco é um carregador de temperatura envolto em um dedo de luva.

Figura 9. Gaiolas e microhabitats semi-naturais do experimento de campo com *Rhinella granulosa*. A) Gaiola utilizada nas poças semi-naturais – o controle do nível da água foi possível com o uso de recipientes plásticos com furos nas laterais (5 cm de altura); **B)** Distribuição das poças semi-naturais – cada recipiente foi alocado em um buraco na terra e as gaiolas foram inseridas no interior dos recipientes, tendo suas posições sorteadas.

7. Experimentos de laboratório

7.1. Normas de reação de variação térmica

A fim de se isolar a variável temperatura e averiguar seus efeitos na sobrevivência, no crescimento e na diferenciação das larvas de *R. ornata* e *R. icterica*, realizamos experimentos de laboratório nos quais os fatores moda da temperatura e variação térmica foram manipuladas. A escolha desses fatores como tratamentos se deu pela análise dos dados de temperatura coletados em campo dos microhabitats larvais nos quais ocorrem as espécies de *Rhinella*, tanto em Boracéia quanto em S. Miguel. Notamos que as modas das temperaturas dos microhabitats de Boracéia são muito similares entre si (em torno de 18°C), mas muito diferentes dos microhabitats de S. Miguel, que ficaram em torno de 27°C. O mesmo ocorre com as temperaturas médias mínimas (aproximadamente 16°C para Boracéia e 25°C para S. Miguel). Já os valores de variação térmica diária são bem diversos dentro do mesmo bioma, mas similares entre os biomas. A diversidade na amplitude térmica é devida à diversidade de temperaturas máximas atingidas em cada microhabitat (ver Figuras 15 e 16 dos Resultados).

Considerando, portanto, que a diferença principal entre os microhabitats medidos em Boracéia e em S. Miguel é a região de variação na escala de temperatura (sendo mais elevada para os microhabitats de S. Miguel), resolvemos simular em laboratório regimes térmicos que variassem similarmente, mas ao redor de modas distintas. Seis tratamentos foram determinados, com três magnitudes de variação térmica ao redor de duas modas de temperatura (Figura 10):

(1) 20°C constante;	}	Regimes simulados da Floresta Atlântica
(2) Moda de 20°C e variação de 4°C;		
(3) Moda de 20°C e variação de 8°C;		
(4) 27°C constante;	}	Regimes simulados da Caatinga
(5) Moda de 27°C e variação de 4°C;		
(6) Moda de 27°C e variação de 8°C.		

Figura 10. Regimes térmicos simulados em laboratório. Os regimes térmicos foram obtidos com o uso de aquecedores ligados a temporizadores. As temperaturas foram medidas a cada 10 minutos, ao longo de no mínimo 2 semanas, por meio de carregadores de dados. Os regimes 1 e 4 são os constantes a 20 °C e 27 °C, respectivamente; os regimes 2 e 5 são os que variaram por volta de 4 °C, nas modas de 20 °C e 27 °C; e os regimes 3 e 6 foram os de maior variação, 8 °C, ao redor das mesmas modas.

Os regimes térmicos foram obtidos com o uso de aquecedores de aquário de 100 W, com termostato (Vigoar ou Atman, São Paulo – SP, Brasil), alocados em bacias plásticas de 20 L. Todas as bacias foram alojadas em uma sala climatizada à temperatura de 17°C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Os regimes 1 e 4, os constantes, foram obtidos pelo uso de aquecedores programados para as temperaturas de 20°C e 27°C, respectivamente. Para simular os regimes 2 e 3, utilizamos dois aquecedores conectados a temporizadores (Megaforth, Blumenau – SC, Brasil). O da temperatura máxima (22°C e 26°C, respectivamente) permaneceu ligado das 06:00 às 11:00, e o da moda (20°C) permaneceu ligado das 11:00 às 22:00. Das 22:00 às 06:00 a água das bacias foi resfriada até a temperatura da sala, por volta de 17 °C. Para os regimes 5 e 6 utilizamos três aquecedores: o da temperatura máxima (29°C e 34°C, respectivamente) ficou ligado por um temporizador das 08:00 às 11:00; o da moda (27°C), das 11:00 às 24:00; e o da temperatura mínima (25°C) permaneceu ligado constantemente. As bacias foram cobertas com tampas de acrílico para que as

temperaturas máximas pudessem ser atingidas. A água foi oxigenada constantemente por meio de bombas de ar (Acqua Flux, Master Ind. De Equip. para Piscicultura, São Paulo-SP, Brasil), cada duas bacias com uma bomba de duas saídas. Cada bacia conteve um carregador de temperatura medindo a cada dez minutos, por um período de no mínimo duas semanas de experimento.

Com o intuito de calcularmos taxas de crescimento e tempos de desenvolvimento individuais, optamos por manter as larvas separadas entre si, na mesma bacia, com o uso de redinhas de aquário. Estas permaneceram apoiadas em um suporte de isopor, e cada bacia conteve 12 redinhas, com um volume aproximado de 0,5 L para cada redinha (Figura 11). Pelo fato da sala climatizada ser heterogênea, devido à posição do equipamento de resfriamento, utilizamos um delineamento em blocos, com todos os tratamentos em cada bloco. Foram 3 blocos – A, B e C – organizados sistematicamente na sala, na tentativa de se distribuir entre os tratamentos os possíveis efeitos da heterogeneidade da sala (Figura 12). A posição dos blocos ficou limitada pela distribuição das tomadas na sala, sendo que não foi possível manter o bloco A todo junto em frente ao equipamento de resfriamento.

Figura 11. Montagem do experimento de laboratório com *R. ornata* e *R. ictérica*. A) Bacias de 20L distribuídas na sala climatizada, com suporte de isopor para 12 redinhas e tampa de acrílico. B) Redinhas para isolamento das larvas – cada bacia conteve 12 redinhas no máximo, de aproximadamente 0,5 L de volume. C) Aumento de uma redinha, mostrando o código de identificação da larva.

Figura 12. Esquema do delineamento do experimento de laboratório com *R. ornata* e *R. ictérica*. O esquema mostra a distribuição das bacias na sala climatizada. O delineamento foi em blocos, sendo 6 tratamentos em cada bloco e 3 blocos (A, B e C) sistematicamente organizados na sala, totalizando 18 bacias. Esse delineamento foi escolhido devido à heterogeneidade presente na sala por conta do vento originado do aparelho de resfriamento.

No dia 5 de setembro de 2009, seis cordões de ovos de *R. ornata* foram encontrados na pedreira, dentro da Estação Biológica de Boracéia; e no dia 15 de novembro, um cordão de *R. ictérica* foi encontrado em uma poça na cachoeira. Além de serem vistos dois casais em amplexo de *R. ornata* na noite do dia 4 de setembro, os cordões de *R. ornata* são facilmente distinguíveis dos de *R. ictérica*, uma vez que os primeiros são menores em comprimento total, menos espessos e com ovos menores que os de *R. ictérica* (ver Figura 13). Fragmentos de aproximadamente cem ovos foram cortados de cada cordão e postos em potes de plástico com água do microhabitat original. Um desses potes (no caso de *R. ornata* e o único no caso de *R. ictérica*) conteve um carregador de temperatura, medindo a cada 30 minutos. No mesmo dia de coleta, transportamos os cordões em uma bolsa térmica até o laboratório na USP, uma viagem de aproximadamente quatro horas.

Figura 13. Amplexo e cordões de ovos de *R. ornata* e *R. icerica* em Boracéia. A) Amplexo de um casal de *R. ornata* na pedreira. **B)** Cordão de ovos de *R. ornata*. **C)** Cordão de ovos de *R. icerica*. **D)** Cordões de *R. ornata*, à direita, e *R. icerica*, em potes de coleta. Note a diferença de tamanho dos ovos das duas espécies.

No laboratório, cada cordão de *R. ornata* foi dividido em 3 bacias, duas alocadas na sala climatizada a 24°C e a terceira permaneceu no biotério a 23°C. Essa divisão foi estabelecida para se evitar a perda de um cordão inteiro caso a bacia se contaminasse. No caso do cordão de *R. icerica*, dividimo-lo em duas bacias que permaneceram na sala climatizada a 23-24°C. Todas as bacias continham bombas de ar. Ao longo dos dias, os ovos que não desenvolveram, assim como os embriões que morreram, foram retirados das bacias a fim de se evitar contaminação da água.

Após três dias de desenvolvimento, a água das bacias foi trocada. Depois de seis dias, as larvas de *R. ornata* e *R. icerica* atingiram os estágios Gosner 25-26, nos quais as brânquias são atrofiadas e o opérculo fica fechado. A distribuição das larvas de *R. ornata* em seus tratamentos não foi possível nesses estágios porque elas ainda estavam muito pequenas para a malha das redinhas, conseguindo atravessá-las. Optamos então por alimentá-las com alface fervido até atingirem um tamanho

suficiente. Para manter o mesmo padrão com *R. icterica*, suas larvas também foram alimentadas antes do início do experimento, mesmo sendo as larvas nos estágios 25-26 de tamanho suficiente para se manterem nas redinhas.

A divisão das larvas nos diversos tratamentos foi feito por sorteio após oito dias de desenvolvimento. Um indivíduo era pego do conjunto inicial de larvas de cada família e atribuído a um tratamento (1 a 6) e a um bloco (A, B ou C). Em seguida, sua posição na bacia (1 a 12) era sorteada. Quando a posição já estava ocupada por outra larva, a próxima posição livre era selecionada. Cada tratamento possuiu duas larvas de cada família (que no caso de *R. ornata*, totalizou doze larvas por bacia, e para *R. icterica* somente duas larvas por bacia, pois houve apenas uma família no experimento). Cada indivíduo possuiu um código de três números, que representava a família, o tratamento e a réplica, respectivamente. De cada família, trinta e seis larvas foram distribuídas nos tratamentos, sendo que cada tratamento teve 6 réplicas/indivíduos por família, totalizando 216 larvas no experimento todo para *R. ornata*, e 36 mesmo para *R. icterica*. Posteriormente ao sorteio, cada larva recebeu alface fervido *ad libitum*.

Somente para as larvas de *R. icterica* foi possível tirar fotos e pesar no dia do sorteio, pois no caso de *R. ornata*, as larvas foram muitas para ser feito o mesmo. As fotos e a pesagem de cada larva foram efetuados a cada dois dias de intervalo, com o uso do mini-aquário e balança de 0,01 g de precisão. A balança foi calibrada em todos os dias nas quais foi usada. As larvas eram retiradas das redinhas, postas no mini-aquário, a foto tirada, e após a larva ser rapidamente seca com papel-toalha, era finalmente pesada, em um pote com água. Em seguida, a larva era devolvida à bacia original. Todo esse procedimento levou em torno de dois minutos por larva. As mortes eram registradas no dia da ocorrência, e os cadáveres retirados das bacias. Essas medições foram repetidas até que todas as larvas atingissem o estágio Gosner 42, finalizando o desenvolvimento larval.

Ao longo do experimento, a água foi trocada semanalmente (3/4 do total), um bloco inteiro por dia. A água era retirada das bacias com um sifão feito de mangueira plástica e depositada em um balde, para ser descartada em seguida. Como as fezes das larvas ficavam depositadas no fundo das bacias, esse método de troca de água foi eficiente para sugar a sujeira. Usamos reservatórios de água de torneira, descansada por um dia (para evaporação do cloro), um com um aquecedor a 20°C e o outro com

aquecedor a 27°C, para a reposição da água nos tratamentos 1-3 e 4-6, respectivamente. Essa prática permitiu que as temperaturas corretas fossem mantidas nos tratamentos após a troca da água, que sempre era feita após as 16:00, quando todos os tratamentos já estavam na moda da temperatura. No momento da troca, o suporte de isopor com as redinhas foi translocado para uma bacia de troca, na qual a água estava na moda da temperatura do tratamento original. Depois da troca, o suporte de isopor era devolvido à bacia original. A alimentação de alface fervido foi conferida a cada um dia de intervalo. Quando as larvas chegaram em estágios mais avançados de desenvolvimento (33-35 para frente), elas passaram a se alimentar mais, e houve ocasiões nas quais se notou falta de comida (que ocorreu somente nos tratamentos quentes). Após a detecção desse fato, a comida era repostada imediatamente.

Ao atingirem o estágio Gosner 42, o início da metamorfose, as larvas foram retiradas das bacias e postas em aquários, e a data registrada para posterior cálculo do tempo de desenvolvimento. Tanto o experimento de *R. ornata* quanto o de *R. icterica* terminaram após 40 dias.

A partir dos dados coletados de massa a cada dois dias, foram calculadas curvas de regressão para cada indivíduo que sobreviveu até a metamorfose, a fim de se usar o coeficiente angular como indicador da taxa de crescimento. A grande maioria das regressões foi linear (87% para *R. icterica* e 91% para *R. ornata*) e somente aquelas com bom ajuste dos dados ($r^2 > 0,85$) foram consideradas para o cálculo das taxas de crescimento e construção de normas de reação de variação térmica. Normas de reação de massa na metamorfose (massa nos estágios Gosner 41/42) e de tempo de desenvolvimento também foram construídas a partir dos dados de laboratório; além de normas de reação bivariadas, ou seja, das relações entre estas três variáveis. Com os dados de contagem das larvas, construímos curvas de sobrevivência cumulativa, com o método Kaplan-Meier.

7.2. Normas de reação de Temperatura Crítica Máxima

Nos dias 24 e 27 de outubro de 2009, um trecho de dois cordões de ovos de *R. ornata* foram coletados; e no dia 15 de novembro de 2009, um trecho de cordão de *R. icterica* foi coletado, todos na EBBoracéia (SP), e transportados ao laboratório. Em

seguida, os cordões foram divididos em duas bacias com água filtrada, na sala climatizada com fotoperíodo controlado 12C : 12E. As bacias possuíam bomba de ar, aquecedor a 24°C e um carregador de temperatura medindo a cada 30 minutos. Após alguns dias da coleta, as larvas de um dos cordões de *R. ornata* foram descartadas, por morte em excesso de anestésico (uretana a 3 g/L), pois apresentaram um desenvolvimento inadequado.

Após uma semana de desenvolvimento, 96 larvas foram pegas e sorteadas em quatro grupos (24 larvas em cada): aclimação a 20°C, por 3 dias; aclimação a 20°C, por 6 dias; aclimação a 30°C por 3 dias; ou aclimação a 30°C por 6 dias; em bacias de 15 L, com aquecedores, bombas de ar e tampadas com tampas plásticas, no interior da sala climatizada a 17°C. Os períodos de aclimação correspondem a 1/4 e 1/2 da duração média do desenvolvimento das larvas de *R. granulosa* em seus microhabitats naturais em S. Miguel. A duração do desenvolvimento larval de *R. granulosa* foi utilizada como referência para os períodos de aclimação para não haver o risco das larvas desta espécie ultrapassarem o tempo de desenvolvimento ao longo da aclimação, tornando-se juvenis e inviabilizando o experimento. A alimentação foi de alface fervido *ad libitum*.

Os experimentos de temperatura crítica máxima (TCMax) foram realizados em um banho-maria, no qual as larvas eram colocadas em dois recipientes plásticos com fundo de tela, 2 larvas por recipiente (Figura 14). As larvas permaneciam dez minutos nesses recipientes à temperatura de seu grupo original (20°C ou 30°C), para se acostumarem com o novo ambiente. Após os dez minutos, iniciávamos o aumento da temperatura à uma taxa de aproximadamente 1°C por minuto (a taxa variou de 0,88°C a 0,93°C). Os testes de aclimação a 20°C e 30°C foram feitos no mesmo dia, intercaladamente, para uma mesma família (desova) e mesmo tempo de aclimação em dias. Depois de um teste, toda a água do banho era retirada por um sifão feito com uma mangueira, e gelo era adicionado à nova água do banho (mantendo-se sempre um mesmo nível de água, que era marcado com fitas adesivas nos potes – ver na Figura 14), na quantidade suficiente, até a mesma atingir a temperatura de 20°C ou 30°C, dependendo de qual teste iria ser o próximo. Em seguida, mais quatro larvas de determinado grupo de aclimação eram postas nos potes (duas em cada), e passados os dez minutos, um novo teste era iniciado. Esse procedimento de intercalação dos

testes a 20°C ou 30°C evitou uma correlação de horário do teste com temperatura de aclimação.

Ao redor dos 38°C, as larvas eram levemente tocadas na cauda com termômetros para estimular o movimento. O experimento foi finalizado quando as larvas não respondiam mais a cinco toques. Nesse momento, a temperatura considerada como a TCMax era registrada com o termômetro e a larva transferida para água a temperatura ambiente, em potinhos de plástico, sendo que a ordem de teste das larvas foi mantida para posterior identificação de cada indivíduo. Testamos entre dez e dezesseis larvas para cada temperatura de aclimação, por família, sendo que o experimento teve duração média de cinco horas. No dia seguinte, as larvas eram conferidas em seus potinhos quanto à sobrevivência, e o dados de TCMax eram considerados válidos somente se a larva estivesse viva.

Figura 14. Montagem dos experimentos de Temperatura Crítica Máxima. A) Banho-maria com as duas caixas de plástico contendo duas larvas cada e um termômetro. **B)** Aumento de uma caixa plástica, mostrando o fundo de tela e a marca com fita do nível de água, garantindo uma taxa de aquecimento similar a cada teste.

8. Análise Estatística

Todos os dados foram testados quanto à normalidade de seus resíduos com testes de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade de variância dos grupos a serem comparados com testes de Levene. Os dados que não se ajustaram às premissas dos testes paramétricos foram testados com testes não-paramétricos. Os dados das distribuições de massa estágio-específica foram analisados com o teste Kolmogorov-Smirnov Z, somente para os estágios de maior número amostral. Os resultados de massa do experimento de campo com *R. icterica* foram analisados com uma ANOVA hierárquica, sendo o fator gaiola aninhado no fator ambiente. As curvas de sobrevivência foram comparadas com testes Log-Rank. Os resultados dos experimentos de laboratório foram testados por ANOVA de duas vias (seguido de teste de Tuckey HSD), Mann-Whitney, se foram dois grupos a serem comparados, ou Kruskal-Wallis, se mais de dois grupos foram comparados. O nível de significância adotado foi de 0,05, mesmo em casos de comparações múltiplas. As tabelas de testes estatísticos considerados relevantes de serem mostradas (Tabelas 2 a 10) estão apresentadas nos anexos.

Resultados

1. *Clima dos locais de estudo*

Os parâmetros pluviosidade, temperatura e radiação solar diária estão apresentados na Figura 15:

Figura 15. Parâmetros climáticos de S. Miguel (A,C,E) e de Boracéia (B,D,F). Os parâmetros mostrados foram medidos com o uso de estações microclimáticas instaladas nos locais de estudo. O registro foi de um ano para Boracéia e um ano e cinco meses para S. Miguel. **A,B)** A distribuição de chuva é mais homogênea em Boracéia que em Miguel, e no segundo ano de medidas neste último local houve uma seca; **C,D)** As temperaturas são mais elevadas no geral em S. Miguel, porém a variação é grande nos dois locais; **E,F)** A radiação solar diária é no geral maior em S. Miguel. Esses gráficos demonstram a grande diferença de clima entre os locais, indicando que S. Miguel tem característica de sertão.

As diferenças entre os locais são bastante grandes: em Boracéia a pluviosidade anual foi de 3.427 mm, com chuvas relativamente bem distribuídas pelos meses (menos chuva nos meses de abril a setembro), enquanto que nos dois anos em S. Miguel foi de 898 e 228 mm, respectivamente, com chuvas concentradas nos meses de fevereiro a abril; a temperatura em Boracéia variou em média entre 14,0°C e 23,7°C (com variações sazonais perceptíveis) e teve média de 17,8°C, ao passo que em S. Miguel, variou em média entre 22,0°C e 35,0°C e teve como média 27,4°C; finalmente, a radiação solar diária média foi de 19.206 W/m² em Boracéia, e de 31.935 W/m² em S. Miguel. Os dados de clima demonstram que S. Miguel é um local tipicamente caracterizado como sertão semi-árido.

2. Descrição dos microhabitats larvais de *Rhinella*

As características principais dos microhabitats larvais estudados em São Miguel e em Boracéia estão apresentadas na Tabela 1. Os microhabitats diferem em relação a tamanho, substrato e profundidade, além de serem distintos tanto em fatores abióticos quanto bióticos. Todos os microhabitats de S. Miguel foram temporários, porém diferiram na permanência por causa das diferenças de tamanho. Os microhabitats maiores foram os açudes (Figura 16A), e os menores e menos permanentes, as poças nas rochas (Figura 16B).

A maioria dos microhabitats de Boracéia analisados estavam distribuídos em dois grandes habitats: o “Poço verde” - uma cachoeira localizada em uma clareira no interior da mata e abastecida pelo Rio Claro e a “Pedreira” – uma área aberta cercada por paredes rochosas e de estrutura de charco (Figura 16C e 16D). A cachoeira é um local muito utilizado para reprodução de *Rhinella*, praticamente de uso exclusivo desse gênero e com poucos predadores; diferentemente da pedreira, que é um local de coexistência de muitas espécies de anuros e de alta pressão de predação. Em Boracéia, as espécies de *Rhinella* também desovaram em microhabitats pequenos (poças na cachoeira e na vegetação).

Quanto à temperatura, notamos que as modas das temperaturas dos microhabitats de Boracéia são muito similares entre si (em torno de 18°C), mas muito diferentes dos microhabitats de S. Miguel, que ficaram em torno de 27°C. O mesmo ocorre com as temperaturas médias mínimas (aproximadamente 16°C para Boracéia e

25°C para S. Miguel). Já os valores de variação térmica diária são bem diversos dentro do mesmo bioma, mas apresenta uma parcela de similaridade entre os biomas (magnitudes de 3°C a 12°C), apesar de S. Miguel apresentar microhabitats temporários de maior variação (14°C a 17,5°C, Figuras 17 e 18). A amplitude térmica média de cada microhabitat apresentou uma correlação de 0,93 e 0,96 com a temperatura máxima média para Boracéia e S. Miguel, respectivamente (Figura 18A testes de correlação de Pearson $p < 0,001$ para ambas). Essa relação forte entre as variáveis amplitude de variação e temperatura máxima mostra que a diversidade dos microhabitats dentro de um mesmo bioma é causada pela diversidade de temperaturas máximas atingidas. Boracéia mostrou-se mais heterogênea espacialmente que o esperado, mesmo sem apresentar variação térmica tão grande quanto S. Miguel.

Figura 16. Habitats e microhabitats estudados em São Miguel (RN) e em Boracéia (SP).
A) Maior açude em S. Miguel, cheio após uma seqüência de chuvas. **B)** Poça nas rochas em S. Miguel, de aproximadamente 1,5 X 1,0 m, com ninhos de espuma. **C)** Cachoeira em Boracéia, com várias poças nas rochas. **D)** Pedreira em Boracéia, com o paredão de rocha ao fundo e aspecto de charco.

Figura 17. Regimes térmicos dos microhabitats larvais em S. Miguel (Caatinga – RN) e em Boracéia (Floresta Atlântica – SP). As temperaturas foram registradas a cada 30 minutos, com uso de carregadores de dados depositados no fundo dos microhabitats, ao longo de vários dias. Estão representados como barras as amplitudes térmicas médias, que são a variação entre as temperaturas mínimas e as máximas médias, considerando-se todos os dias medidos. Os pontos são as modas de temperatura.

Figura 18. Relação entre amplitude térmica média e temperatura máxima média (A) e distribuições de desvios padrão das temperaturas médias mínimas (B) e máximas (C) dos microhabitats de Boracéia (azul) e São Miguel (vermelho). A temperatura dos microhabitats foi medida com o uso de carregadores de dados depositados no fundo de cada microhabitat, a cada 30 minutos. Cada ponto ou barra nos gráficos correspondem a um microhabitat particular. (A) A reta representa a correlação entre as variáveis (Teste de correlação de Pearson $r = 0,93$ e $r = 0,96$, para Boracéia e S. Miguel, respectivamente). (B), (C) As distribuições dos microhabitats de Boracéia são mais à direita que os de S. Miguel, mostrando que existe maior variação dia a dia nesses primeiros.

As distribuições de desvios padrão das temperaturas médias mínimas (Figura 18B) e máximas (Figura 18C) dos microhabitats de Boracéia são mais deslocadas à direita que as distribuições de S. Miguel. Isso demonstra que os microhabitats de Boracéia variam mais dia a dia nas suas temperaturas mínimas e máximas, sendo por conseguinte mais imprevisíveis.

Tabela 1. Características físicas e bióticas dos microhabitats larvais de *Rhinella* em São Miguel (RN) e Boracéia (SP).

Microhabitats	Tamanho	Profundidade (m)	Substrato
São Miguel			
Açude 1	muito grande	vários metros	terra
Açude 2	grande	1,00	terra
Poça açude	médio	0,11	terra
Poça vegetação	pequeno	0,17	terra
Poças rochas	muito pequeno	0,05 - 0,13	rocha
Boracéia			
Poço cachoeira	grande	1,50	rocha
Poças cachoeira	pequeno	0,05	rocha
Lago	médio	1,00	terra
Pedreira	grande	0,20 - 0,30	terra
São Miguel	pH	Outros gêneros	Predadores
Açude 1	7,0 + 0,5	Muitos *	Peixes **
Açude 2	7,0 + 0,5	<i>Physalaemus</i> , <i>Scinax</i>	Insetos aquáticos, larvas de insetos
Poça açude	7,1 + 0,3	Muitos *	Não detectados
Poça vegetação	7,2 + 0,7	Ausentes	Não detectados
Poças rochas	8,6 + 2,0	Ausentes	Ausentes
Boracéia			
Poço cachoeira	6,5 + 0,7	Ausentes	Peixes **
Poças cachoeira	6,7 + 0,4	Ausentes	Insetos aquáticos, larvas de insetos
Lago	5,5 + 0,5	<i>Hypsiboas</i> , <i>Leptodactylus</i>	Não detectados
Pedreira	6,1 + 0,7	Muitos *	Insetos aquáticos, larvas de insetos

* Grande parcela das espécies do local: S. Miguel- *Pleurodema diplolistris*, *Physalaemus* sp., *Scinax*, *Phyllomedusa hypochondrialis*; Boracéia - *Hypsiboas polytaenia*, *Hypsiboas faber*, *Hypsiboas microps*, *Hypsiboas pardalis*, *Hypsiboas multilineata*, *Physalaemus cuvieri*.

** Possivelmente também há insetos e larvas.

3. Distribuição natural de massa estágio-específica

Encontramos uma maior variação de massa estágio-específica para as larvas livres de *R. granulosa* (Figura 19). Não houve diferença na média da massa para os estágios com maior número amostral (34 n=19 para ambos os microhabitats, 35 n=11 para ambos e 37 n=10, n=8) entre os microhabitats “Poço da cachoeira” e “Poça cachoeira” de Boracéia (testes Kolmogorov-Smirnov Z p=0,15; p=0,28 e p=0,36; respectivamente), porém para os estágios 35 e 41 (n=16 para ambos os microhabitats, n=15 para ambos, respectivamente), a massa média dos microhabitats “Açude menor” e “Açude maior” foram diferentes (testes Kolmogorov-Smirnov Z p<0,05 e p<0,01, respectivamente). Comparações com os microhabitats “Pedreira” e “Poça” não foram feitas pelo pequeno número amostral de peso por estágios. Esse resultado sugere uma maior plasticidade na massa de *R. granulosa* diante das larvas de *R. icterica* e *R. ornata*, porém ele pode estar atrelado somente aos microhabitats estudados, e não representar um padrão geral.

Figura 19. Distribuição massa estágio-específica de larvas livres de *Rhinella* nos microhabitats de Boracéia (A) e São Miguel (B). As larvas foram coletadas ao longo de vários dias, pesadas e estagiadas com o uso da tabela de identificação de Gosner (1960). Estão representados a massa média e os respectivos desvios padrão. A variação da massa é maior nos microhabitats de S. Miguel, porém a sequência para o microhabitat “Pedreira” de Boracéia está incompleta devida à alta mortalidade das larvas no período analisado.

4. Experimentos de campo

4.1. Plasticidade da massa em *R. icterica*

Houve uma diferença muito maior na massa final que nos estágios de desenvolvimento das larvas de *R. icterica* submetidas ao experimento de campo (Figura 20). A mediana da massa final das larvas distribuídas na cachoeira foi praticamente duas vezes maior que das larvas na pedreira, e também houve diferença entre as duas gaiolas na cachoeira (Figura 20B). O fator ambiente explicou 99% da variação dos dados, e o sub-fator gaiola explicou 21% da variação dos dados dentro do ambiente cachoeira (Tabela 2). Os regimes térmicos das gaiolas possuíram modas bastante similares (19,7°C; 20,1°C - cachoeira; 21,1°C e 21,3°C – pedreira), porém as amplitudes térmicas foram maiores para as gaiolas na pedreira (13°C contra 4°C). As diferenças na massa mostram que as larvas de uma mesma família de *R. icterica* possuem plasticidade na massa em condições próximas das naturais, tanto dentro de um mesmo ambiente (diferença na média da massa nas gaiolas da cachoeira, Tabela 3) quanto entre ambientes.

Figura 20. Estágios de desenvolvimento (A) e massa final (B) das larvas de *R. icterica* submetidas a experimento de campo com gaiolas. Uma desova de *R. icterica* foi distribuída em quatro gaiolas dispostas duas a duas em dois ambientes distintos: cachoeira e pedreira. Cada gaiola teve 30 larvas no início do experimento. A cada semana, o número de larvas era contabilizado e a massa e estágio das larvas determinados. Os boxplots representam a mediana (traço), 50% (retângulo) e 95% da distribuição dos dados. (A) O experimento foi finalizado quando a maioria das larvas restantes em cada gaiola atingiu os estágios Gosner 39/40. (B) A mediana da massa foi aproximadamente duas vezes maior para o ambiente cachoeira. As letras indicam as diferenças entre as médias dos grupos (ANOVA hierárquica seguido de teste de Tukey).

4.2. Curvas de sobrevivência

O único parâmetro em campo que pôde ser comparado entre as três espécies de *Rhinella* foram as curvas de sobrevivência (Figura 21). Observando-se as quedas das curvas, notamos três padrões correspondentes a cada espécie: as mortes nas larvas de *R. granulosa* somente ocorrem após 2/3 do desenvolvimento, com uma queda brusca na maioria dos casos (Figura 21A); em *R. ictérica*, a queda é bem gradual, para os dois ambientes, havendo uma mesma proporção de morte ao longo de todo o desenvolvimento (Figura 21B); e finalmente, em *R. ornata*, a queda mais brusca ocorre logo no início do desenvolvimento, e depois passa a ser gradual (Figura 21C). Os regimes térmicos das gaiolas de *R. ictérica* foram os descritos no item anterior, e os de *R. ornata* tiveram moda e amplitude de 22,3 °C e 7,4 °C ; e 22°C e 5,4°C. As únicas curvas que diferiram dentro de uma mesma espécie foram as de *R. granulosa* (Tabela 4), indicando que há variação na sobrevivência entre famílias dessa espécie para microhabitats similares, que foi uma simulação de poça temporária bem rasa. Os regimes térmicos obtidos foram correspondentes com poças pequenas naturais, atingindo uma temperatura máxima média de 37°C, e por vezes chegando a 40°C (Figura 21D).

Figura 21. Curvas de sobrevivência cumulativa obtidas em campo para *R. granulosa* (A), *R. ictérica* (B) e *R. ornata* (C); e regimes térmicos simulados em campo para *R. granulosa* (D). As gaiolas iniciaram com 30 larvas cada, no estágio Gosner 27, e foram dispostas nos microhabitats indicados nas legendas. A cada 3 dias (*R. granulosa*) ou a cada 7 dias (*R. ictérica* e *R. ornata*) as larvas em cada gaiola eram contabilizadas. Em D estão mostrados os regimes térmicos obtidos na simulação de poças temporárias.

4.3. Massa das fêmeas e dos cordões de *Rhinella granulosa*

Existe uma clara relação linear positiva entre a massa das fêmeas de *R. granulosa* e a massa de seus respectivos cordões de ovos (Figura 22, teste de regressão linear $F = 38,93$ $p < 0,001$), mostrando que quanto maior a fêmea, maior o cordão de ovos. A variação da massa da fêmea explicou 73% da variação da massa do cordão.

Figura 22. Relação entre massa do cordão de ovos e massa da fêmea de *R. granulosa*. Os dados apresentados no gráfico referem-se a 15 casais de *R. granulosa* coletados em amplexo para o experimento de campo. Estes foram postos em bacias com água, onde desovaram cordões de ovos. As fêmeas e seus respectivos cordões foram pesados com uso de uma balança de 0,01 g de precisão. Está representada a reta de regressão e os intervalos de confiança, que descrevem a relação: $\text{Massa cordão} = 0,26 + 2,5 (\text{Massa da fêmea})$.

5. Experimentos de laboratório

5.1. Desenvolvimento de *R. ornata* e *R. icterica*

5.1.1. Regimes térmicos simulados

Os regimes térmicos simulados em laboratório para *R. ornata* e *R. icterica* estão apresentados na Figura 23. Houve alguma variação nas modas dentro dos tratamentos mais frios (1,2 e 3) para *R. ornata* (18,5°C a 21°C), assim como para *R. icterica* (17°C a 18,5°C), mostrando que as larvas de *R. icterica* desenvolveram em regimes mais frios no geral. Quanto aos tratamentos mais quentes (4, 5 e 6), também houve uma variação nas modas, de 26,5°C a 28°C para *R. ornata*, e de 26°C a 28,5°C, para *R. icterica*. Essas variações ocorreram devido à heterogeneidade da sala climatizada e dos próprios aquecedores. Entretanto, a grande diferença nas modas dos tratamentos frios em relação aos quentes foi presente para ambas as espécies, ficando

em torno de 8°C, um valor bastante similar à diferença natural dos locais de estudo (ver a diferença nas modas da figura 17). Apesar dos tratamentos terem sido delineados segundo as modas (20°C para os tratamentos 1,2 e 3; e 27°C para os tratamentos 4,5 e 6), achamos importante também verificar as médias dos mesmos. As médias dos regimes, em geral, não diferiram por mais de 1,5°C das modas do mesmo regime, embora em alguns tratamentos tanto a moda quanto a média diferiram por mais de 1°C da moda prevista.

Quanto à amplitude térmica média, notamos que os tratamentos A3, C3, C5 e A6 de *R. ornata* ficaram aquém do programado, devido a falhas nos aquecedores ao longo do tempo (Figura 23A). Para *R. icterica*, somente o regime B3 teve variação menor que a esperada (Figura 23B).

Figura 23. Regimes térmicos simulados em laboratório para experimento de desenvolvimento com *R. ornata* (A) e *R. icterica* (B). Os regimes foram obtidos com o uso de aquecedores ligados a temporizadores, em bacias plásticas de 15 L. Os tratamentos 1 a 3 foram programados para moda de 20°C e os 4 a 6, moda de 27°C. As barras são a amplitude térmica média e os pontos são as modas.

5.1.2. Curvas de sobrevivência

As curvas de sobrevivência cumulativa das larvas de *R. ornata* foram diferentes entre os tratamentos (Figura 24A, Tabela 5), enquanto as de *R. icterica* foram similares (teste Log-Rank $\chi^2 = 6,96$ e $p = 0,22$) e de alta sobrevivência em geral (Figura 24B). Todos os tratamentos mais frios (1 a 3) diferiram de dois dos mais quentes (4 e 6), para *R. ornata*. A grande diferença nas curvas de sobrevivência pode ser verificada no décimo dia de experimento, no qual as quedas de sobrevivência para os tratamentos frios foram mais acentuadas.

Figura 24. Sobrevivência cumulativa das larvas de *R. ornata* (A) e *R. icterica* (B) expostas aos regimes térmicos simulados em laboratório. Em cada bacia, as larvas foram contabilizadas a cada 2 dias. As curvas mostram a fração de indivíduos sobreviventes do total, ao longo dos dias, para cada tratamento. **A)** Todas as famílias foram consideradas juntamente. Há uma grande mortalidade por volta do décimo dia de experimento, principalmente nos tratamentos mais frios (em azul). **B)** Curvas para somente uma família. A mortalidade também é acentuada por volta do décimo dia, mas relativamente, *R. icterica* teve menos morte.

5.1.3. Normas de reação bivariadas

As relações entre as três variáveis dependentes foram analisadas para *R. ornata* (Figura 25, Tabela 6) e *R. icterica* (dados não mostrados) por meio de correlações. Ao plotarmos todo o conjunto de dados, percebemos que existe uma separação clara entre os pontos correspondentes a moda de 20°C e os de moda 27°C. A taxa de crescimento apresentou uma correlação negativa com o tempo de desenvolvimento para as duas modas, sendo que as taxas de crescimento variaram mais com o tempo de desenvolvimento para os dados de moda 27°C, ou seja, houve uma maior plasticidade para essa relação nessa moda (Figura 25A). Além disso, as maiores taxas de crescimento foram obtidas na moda mais quente. O padrão oposto observado para as duas modas nas correlações entre massa na metamorfose e tempo de desenvolvimento indica que prolongar o desenvolvimento na moda mais fria acarretou em maior massa, enquanto que na moda mais quente, prolongar o desenvolvimento acabou por reduzir a massa (Figura 25B). A massa na metamorfose aumentou com a taxa de crescimento para ambas as temperaturas, sendo a plasticidade similar (inclinações das retas similares). Porém, para uma mesma taxa de crescimento, a massa a 27°C foi sempre menor (Figura 25C). Os padrões foram semelhantes para *R. icterica*, mas somente a correlação entre taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento a moda de 20°C foi significativa.

5.1.4. Efeitos da moda e da variação térmica

As variáveis taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento e massa na metamorfose foram analisadas separadamente, pois como foi mostrado no item anterior, não há uma dependência dessas variáveis para o conjunto completo dos dados. Para *R. ornata*, o fator família, analisado como aleatório, não teve efeito em nenhuma das variáveis (ANOVA $F = 0,37$ $p = 0,82$ para taxa de crescimento; $F = 0,14$ $p = 0,96$ para tempo de desenvolvimento e $F = 0,41$ $p = 0,80$ para massa na metamorfose; Figura 12). Já o fator bloco, também analisado como aleatório, teve efeito sobre a taxa de crescimento (ANOVA $F = 4,9$ $p = 0,09$) e sobre o tempo de desenvolvimento (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 8,35$ $p = 0,015$). Para ambas as variáveis, o bloco 3 foi diferente dos demais. Essa diferença pode ter se dado pela maior morte em

geral das larvas que desenvolveram no bloco 3 ($n = 24$, enquanto que para os blocos 2 e 3, $n = 34$ e $n = 42$, respectivamente).

Figura 25. Relações entre taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento e massa na metamorfose para as larvas de *R. ornata* submetidas ao experimento de desenvolvimento. As larvas foram submetidas a seis regimes térmicos distintos, sendo três deles de moda de 20°C e variação de 0, 4 e 8°C (pontos azuis) e três deles de moda 27°C e as mesmas variações (pontos vermelhos). A cada dois dias, as larvas eram pesadas, e as taxas de crescimento correspondem aos coeficientes angulares de regressões entre massa e tempo. Quando as larvas atingiram os estágios Gosner 41-42, a massa na metamorfose foi determinada e o tempo de desenvolvimento desde o início do experimento foi contabilizado. As retas cheias representam correlações significativas e as curvas são os intervalos de confiança. **A) Taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento. B) Massa na metamorfose e tempo de desenvolvimento. C) Massa na metamorfose e taxa de crescimento.**

Figura 26. Taxa de crescimento (A), tempo de desenvolvimento (B) e massa na metamorfose (C) das famílias de *R. ornata* submetidas ao experimento de desenvolvimento. As larvas foram submetidas a seis regimes térmicos nos quais se variou a moda (20°C ou 27°C) e a magnitude de variação térmica (0°C, 4°C ou 8°C). As taxas de crescimento são coeficientes angulares de regressões entre massa e tempo. O tempo de desenvolvimento e a massa na metamorfose foram registrados assim que atingiram os estágios Gosner 41-42. Os boxplots representam a mediana (traço), 50% (retângulos) e 95% (barras) da variação dos dados. Nenhuma família diferiu para as variáveis apresentadas.

As taxas de crescimento de *R. ornata* foram maiores (teste de Mann-Whitney $U = 542,5$ $p < 0,001$) e de maior variância a 27°C de moda (teste de Levene $p < 0,001$; Figura 27A), enquanto que os tempos de desenvolvimento foram menores nessa mesma moda (teste de Mann-Whitney $U = 85,5$ $p < 0,001$; Figura 27B). Quanto aos efeitos da variação térmica, as taxas de crescimento foram menores nas maiores variações de temperatura (teste de Kruskal-Wallis $\chi^2 = 11,2$ $p = 0,04$; Figura 27D) e não houve diferença nos “ranks” dos grupos para o tempo de desenvolvimento (teste de Kruskal-Wallis $\chi^2 = 2,11$ $p = 0,34$; Figura 27E), apesar da variância dos tempos de desenvolvimento ser menor na variação de 8°C (teste de Levene $p < 0,001$). A ANOVA de duas vias para a massa na metamorfose (única variável que teve distribuição normal dos resíduos e homogeneidade de variância) das larvas de *R. ornata*, considerados os fatores moda e variação da temperatura como fixos, foi

significativa para ambos os fatores isolados e para a interação entre eles (Figuras 27C e 27F, Tabela 7). A massa foi menor na moda correspondente ao tratamento de maior temperatura e nos maiores valores de variação térmica. A interação entre moda e variação térmica amenizou o efeito da moda, sendo que nas variações de 4°C e 8°C a massa na metamorfose a 20°C e a 27°C de moda foram as mesmas (Figura 29C).

Figura 27. Efeitos independentes dos fatores moda e variação da temperatura nas variáveis taxa de crescimento (A e D), tempo de desenvolvimento (B e E) e massa na metamorfose (C e F) em *R. ornata*. As três variáveis foram medidas nas larvas de *R. ornata* que foram submetidas ao experimento de desenvolvimento, no qual testou-se os efeitos da moda da temperatura e de sua variação. As taxas de crescimento foram obtidas pelos coeficientes angulares de regressões massa por tempo, e a massa na metamorfose e o tempo de desenvolvimento foram determinados quando as larvas atingiram os estágios Gosner 41/42. Os boxplots representam a mediana (traço), 50% (retângulos) e 95% (barras) da variação dos dados. * $p < 0,001$ ANOVA; # $p < 0,001$ Mann-Whitney; a, b Kruskal-Wallis, seguido de Dunnett T3 $p < 0,05$; c, d ANOVA seguido de Tuckey $p < 0,01$.

Para *R. icterica*, não houve a possibilidade de avaliar efeito de família, pois somente uma foi testada. Houve efeito de bloco somente para o tempo de desenvolvimento (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 8,35$ $p = 0,015$), e assim como para *R. ornata*, o bloco distinto foi o 3. Os efeitos da moda nas variáveis de *R. icterica* foram similares aos de *R. ornata*. A taxa de crescimento média foi maior para a moda de 27°C, e houve interação entre moda e variação da temperatura (Figura 28A, Tabela 8) e o tempo de desenvolvimento foi menor nessa moda (teste de Mann-Whitney $U = 2,0$ $p < 0,001$; Figura 28B).

Figura 28. Efeitos independentes dos fatores moda e variação da temperatura nas variáveis taxa de crescimento (A e D), tempo de desenvolvimento (B e E) e massa na metamorfose (C e F) em *R. icterica*. Os procedimentos para obtenção das variáveis foram os mesmos descritos na figura anterior. Os boxplots representam a mediana (traço), 50% (retângulos) e 95% (barras) da variação dos dados. * $p < 0,001$ ANOVA; # $p < 0,001$ Mann-Whitney.

Nenhum fator foi significativo para a massa na metamorfose das larvas de *R. icterica*, apesar do modelo ter sido significativo (Figura 28C e 28F, Tabela 9). Esse resultado foi distinto de *R. ornata*. Além disso, a variação da temperatura não causou efeitos significativos em nenhuma das variáveis de *R. icterica* (Figuras 28D, 28E e 28F), sendo esse padrão bastante diferente de *R. ornata*. Porém, uma semelhança entre as espécies são os efeitos de interação entre moda e variação da temperatura (Figura 29). No geral, maiores variações térmicas causam uma maior igualdade entre os valores médios das variáveis dependentes para as duas modas. Ou seja, a interação entre moda e variação ameniza os efeitos isolados da moda.

Figura 29. Efeitos de interação entre moda e variação da temperatura nas larvas de *R. ornata* (A, B e C) e de *R. icterica* (D, E e F) submetidas ao experimento de desenvolvimento. As retas são a média e o desvio padrão. Os efeitos de interação são perceptíveis quando uma ou mais retas não são paralelas às demais. Para a taxa média de crescimento (A, D) e para o tempo médio de desenvolvimento (B, E) as retas correspondentes à variação de 8°C foram as mais distintas das demais variações, indicando que nessa magnitude de variação o efeito isolado da moda é amenizado. Para a massa na metamorfose (C e F), a variação de 4°C foi a mais distinta para as duas espécies, também amenizando o efeito isolado da moda. Porém, em *R. icterica*, a variação de 8°C também causou o mesmo efeito.

5.1.5. Normas de reação de variação térmica

No geral, as formas das normas de reação de variação térmica de *R. ornata* e *R. icterica* são muito similares entre si para as três variáveis consideradas (Figura 30). Nenhuma das normas foi totalmente linear, ocorrendo mudanças de direção para ambas as espécies. A plasticidade nas variáveis taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento foi muito grande, sendo que as larvas foram capazes de aumentar a primeira em duas vezes e reduzir a última em aproximadamente três vezes. Todavia, notamos que as normas de taxa média de crescimento e tempo médio de desenvolvimento de *R. icterica* possuem um regime térmico ótimo distinto do de *R. ornata* (Figuras 30A e 30B). Consideramos como o ótimo o tratamento que causou a maior taxa média de crescimento e o menor tempo de desenvolvimento (27°C constante em *R. ornata* e 25 – 29°C em *R. icterica*), ou seja, o tratamento que otimizou o desenvolvimento das larvas. As normas de massa média na metamorfose apresentaram um padrão de intensa canalização da massa na maior parte da variação de regimes térmicos imposta (Figura 30C). O valor canalizado é o mesmo para ambas as espécies, por volta de 0,25 g. O valor máximo de massa na metamorfose foi maior para *R. ornata*, apesar de o regime térmico de 20°C constante ser o ótimo para a massa em ambas as espécies. Uma última diferença a ser destacada foi a perda da canalização da massa em *R. ornata* no regime térmico de 25 - 34°C, que não ocorreu em *R. icterica*.

5.2. Normas de reação de Temperatura Crítica Máxima

A tolerância térmica máxima das larvas das três espécies foi determinada pela temperatura crítica máxima (TCMax). Os fatores espécie, temperatura de aclimação, e a interação entre eles foram significativos (Tabela 10). A 20°C de aclimação, as TCMax de *R. ornata*, *R. icterica* e *R. granulosa* foram 39,6°C; 41,2°C e 43°C, respectivamente; enquanto que a 30°C de aclimação, foram de 42,5°C; 42,5°C e 44,4°C, respectivamente (Figura 31). Observando a figura, percebemos que *R. granulosa* possui maior TCMax nas duas temperaturas de aclimação, com uma

norma de mesma inclinação que *R. icterica*, mas deslocada para cima. A norma de *R. ornata* é a mais plástica, porém a de menor tolerância a 20°C de aclimação.

Figura 30. Normas de reação de variação térmica de variáveis do desenvolvimento das larvas de *R. ornata* e *R. icterica*. As retas são a média e o desvio padrão. As larvas de ambas as espécies foram submetidas aos seis regimes térmicos mostrados no eixo das abscissas, e as variáveis taxa de crescimento (A), tempo de desenvolvimento (B) e massa na metamorfose (C) foram determinadas para cada indivíduo. As normas são muito similares para ambas as espécies, apesar do ótimo fisiológico (maior taxa média de crescimento e menor tempo médio de desenvolvimento) ser diferente. Observe a intensa canalização da massa média na metamorfose por volta de 0,25g para ambas as espécies.

Figura 31. Normas de reação de temperatura crítica máxima das larvas de *R. ornata*, *R. ictérica* e *R. granulosa*. As retas são a média e o desvio padrão. As larvas das três espécies foram aclimatadas a 20°C ou 30°C por três dias, e posteriormente aquecidas a 1°C/min até atingirem sua temperatura crítica máxima (imobilidade). *R. granulosa* é a espécie de maior tolerância. *R. ornata* e *R. ictérica* diferiram na tolerância a 20°C de aclimação. *R. ornata* foi a espécie de maior plasticidade na temperatura crítica máxima.

Discussão

1. Heterogeneidade ambiental

A história ecológica e o clima peculiar da caatinga configuram um ótimo contexto para o estudo de fenômenos evolutivos relacionados com mudanças ambientais, como plasticidade fenotípica e adaptação. O processo de aridificação que ocorreu e ainda ocorre na caatinga caracteriza um tipo de mudança ambiental recente, considerando a escala evolutiva, porém gradual se compararmos com processos como fragmentação de habitats (Tilman, May *et al.*, 1994). Para se especular sobre a magnitude da alteração ambiental que se passou na caatinga, os vários trabalhos que sugerem que esse bioma era similar a uma mata úmida são de muita relevância (Bigarella e Andrade-Lima, 1982; Hartwig e Cartelle, 1996; de Vivo, 1997; Carnaval, 2002), pois conferem uma referência de características ambientais a qual podemos comparar com a caatinga em seu estado atual.

A referência de mata úmida que selecionamos para comparar com a caatinga foi a floresta atlântica, e a variável representativa da mudança foi a temperatura. No entanto, supusemos que considerar somente a moda ou a média da temperatura seria muito simplista, então outra variável selecionada foi a variação da temperatura. É certo que um processo complexo como a aridificação de uma região presume um conjunto de diversas alterações ambientais correlatas. Como mostramos com os dados de clima dos locais de estudo, outros fatores ambientais também foram alterados, além da temperatura. A pluviosidade e a radiação solar diária foram bastante distintas entre os dois locais, e indicam que S. Miguel tem um clima típico de sertão. Outros fatores não analisados nesse estudo, como a dieta e a disponibilidade de recursos, inclusive a direção ou força de interações bióticas, também devem ter sofrido alterações que atuam nos processos fisiológicos e no desenvolvimento das larvas das espécies que habitam a caatinga. Todavia, para uma primeira análise dessa mudança ambiental na fisiologia das larvas, a temperatura e sua variação pareceram-nos de grande relevância pelo alcance de seus efeitos, já descritos em diversos processos fisiológicos (Hochachka e Somero, 2002) e em variáveis ligadas ao desenvolvimento de larvas de

anfíbios anuros (por exemplo, (Smith-Gill e Berven, 1979; Olsson e Uller, 2002; Arendt, 2006; Niehaus, Wilson *et al.*, 2006).

Detectamos uma diferença grande entre as modas de temperatura dos microhabitats de São Miguel (caatinga) e os de Boracéia (floresta atlântica), em torno de 7°C; e essa diferença foi suficiente para deflagrar diversos efeitos na plasticidade de desenvolvimento e na tolerância térmica das espécies em estudo. Porém, notamos uma sobreposição de magnitudes de variação térmica entre os locais de estudo, indicando que tanto S. Miguel quanto Boracéia apresentam heterogeneidade espacial de microhabitats de desenvolvimento. Ainda assim, em S. Miguel, encontramos microhabitats temporários que apresentaram uma variação de temperatura diária maior que os de Boracéia, como o esperado.

Segundo a “Teoria da Aptidão em Ambientes Heterogêneos” (Levins, 1962; 1963), a heterogeneidade ambiental é uma condição necessária para o surgimento e manutenção de plasticidade fenotípica. Portanto, a heterogeneidade espacial observada para ambos os locais estudados pode ter contribuído para a plasticidade das larvas. Os dados de tolerância térmica das três espécies estão de acordo com essa suposição. Sendo as temperaturas críticas máximas (TCMax) das espécies superiores às temperaturas máximas ambientais (Tmax), os indivíduos possuem a capacidade fisiológica de se desenvolver em diversos microhabitats (considerando apenas a temperatura), uma vez que toleram a diversidade de temperaturas máximas. Essa tolerância permite que as larvas desenvolvam-se em microhabitats térmicos diversos, favorecendo o surgimento e a manutenção de plasticidade nas variáveis de desenvolvimento.

Contudo, além da heterogeneidade espacial, ambos os locais possuem heterogeneidade temporal, que pode ser decomposta em duas escalas: grossa – o indivíduo experimenta o mesmo ambiente ao longo da ontogenia, e fina – o indivíduo experimenta variação ambiental ao longo da ontogenia (Schlichting e Pigliucci, 1998). A escala fina facilita o surgimento de uma plasticidade de modulação fenotípica, enquanto que a grossa facilita o surgimento de fenótipos especialistas de cada ambiente. As distribuições de desvios padrão das temperaturas médias mínimas e máximas construídas para os microhabitats de Boracéia e de S. Miguel indicam o quanto estes variam dia a dia, ou seja, o quanto variam ao longo do desenvolvimento de um indivíduo (variação em escala fina). Os microhabitats de Boracéia são mais

heterogêneos temporalmente em escala fina que os de S. Miguel, significando que em Boracéia existem condições mais favoráveis para a ocorrência de modulação fenotípica. Os dados de desenvolvimento em laboratório com as espécies de floresta atlântica *R. ornata* e *R. icterica* são concordantes com uma alta plasticidade de larvas providas de microhabitats com variação de temperatura em escala fina.

É bastante interessante notar que apesar dos microhabitats de Boracéia serem mais heterogêneos temporalmente, o que facilita o surgimento de plasticidade, eles também são mais imprevisíveis, o que dificulta a manutenção de plasticidade adaptativa. O fato de vários microhabitats de Boracéia apresentarem altos desvios padrão ao redor da média de temperatura indica que as mínimas e máximas não são as mesmas ao longo dos dias. Diferente dos microhabitats de S. Miguel, que possuem desvios pequenos, indicando que as temperaturas mínimas e máximas são bem similares entre si, dia a dia. A previsibilidade da variação ambiental é um requisito muito importante para que uma resposta plástica adaptativa possa surgir (Newman, 1992). As larvas somente poderão apresentar um fenótipo mais vantajoso em determinada condição se esta condição for possível de ser detectada, ou seja, se ela for previsível de alguma forma. É possível, por conseguinte, que as larvas da floresta atlântica estejam em condições ambientais que favoreçam maior plasticidade de desenvolvimento, mas esta não ser necessariamente adaptativa.

Além da heterogeneidade temporal ontogenética, ambos os locais apresentam heterogeneidade temporal entre gerações. A disponibilidade de microhabitats pode variar em S. Miguel diante dos ciclos de chuva e seca ao longo dos anos. Nos anos de seca, como o de 2010, a chuva é ainda mais escassa, e somente poças temporárias pequenas se formam (observações pessoais). Nesse ano, até o mês de abril, os adultos de *R. granulosa* não reproduziram. O comportamento reprodutivo dessa espécie, apesar de explosivo, não é idêntico ao de outras espécies que habitam a caatinga, como *Physalaemus sp* e *Pleurodema diplolistris*, que se reproduzem mesmo em anos de chuvas bastante escassas. Aparentemente, a reprodução de *R. granulosa* ocorre somente em poças maiores, que se formam quando há mais chuva no ano. Portanto, pode ser que essa espécie não experimente a heterogeneidade temporal entre gerações como outras espécies da caatinga.

Devido à grande extensão da época reprodutiva das espécies *R. ornata* e *R. icterica*, que se reproduzem desde o inverno (junho/julho) até o verão

(novembro/dezembro para *R. ornata* e até fevereiro/março para *R. icterica*; Bertoluci e Rodrigues, 2002), as populações de larvas dessas espécies experimentam uma ampla variação sazonal de temperatura, que se reflete na variação dos microhabitats. Logo, considerando todo o conjunto de heterogeneidade ambiental, parece que as populações de larvas das espécies da floresta atlântica apresentam maior variação de temperatura que *R. granulosa*. Essa sugestão dos dados vai contra a nossa previsão de que a caatinga seria mais heterogênea que a floresta atlântica.

2. Heterogeneidade ambiental e Plasticidade da massa larval

Para entendermos se a alta heterogeneidade ambiental encontrada na floresta atlântica realmente resulta em uma alta plasticidade das larvas desse ambiente, precisamos analisar se existe uma relação positiva entre essas duas variáveis. A heterogeneidade dos microhabitats encontrada em S. Miguel refletiu-se na massa estágio-específica de larvas livres de *R. granulosa*. A maior diferença na massa se deu entre o açude maior e o açude menor, que possuíam regimes térmicos bastante distintos. O açude maior tem a menor moda e a menor variação de temperatura, comparado com os demais microhabitats de S. Miguel estudados, e a massa das larvas foram menores nesse microhabitat. Não obstante, existem outras diferenças entre os dois açudes além dos regimes térmicos, como os tipos de predadores, a densidade total de larvas, a dieta, entre outros. O padrão encontrado pode ser fruto da ação conjunta de várias variáveis, inclusive de interações com a própria temperatura.

Contrário às larvas de *R. granulosa*, as larvas livres das espécies de Boracéia não apresentaram variação natural na massa estágio-específica diante de microhabitats diferentes como o poço da cachoeira e uma poça temporária do mesmo habitat. Assim como para *R. granulosa*, outros fatores devem ter agido no desenvolvimento das larvas livres além da temperatura. Além disso, a impossibilidade de distinção entre as larvas de *R. icterica* e *R. ornata* na natureza pode ter mascarado possíveis variações na massa. Em contraponto, a grande plasticidade na massa ao final do desenvolvimento, encontrada para *R. icterica* no experimento de campo, favorece o argumento de que a heterogeneidade de variação térmica produz variação na massa nessa espécie. Os microhabitats escolhidos para esse experimento – pedreira e poço da cachoeira – apresentaram as mesmas moda e média de temperatura (em torno de 20°C), mas

amplitudes térmicas muito distintas, sendo três vezes mais variável na pedreira (por ocorrerem temperaturas máximas bem maiores que no poço da cachoeira). O uso das gaiolas, permitindo o acompanhamento das mesmas larvas e impedindo a ação de potenciais predadores; a alimentação idêntica (alga) e o uso de larvas providas de uma mesma desova reduziram as diferenças entre os microhabitats de outros fatores além da temperatura, promovendo maior confiança na ação desse fator no desenvolvimento. A diferença de praticamente duas vezes na massa das larvas que desenvolveram na pedreira e das que desenvolveram no poço da cachoeira, além da diferença menor encontrada entre as gaiolas dentro do habitat cachoeira, sugerem que as diferenças de variação térmica são efetivas em suscitar plasticidade fenotípica em *R. icterica*.

Essa sugestão final está de acordo com a teoria de Levins (1962, 1963) e com estudos experimentais, tanto intra-populacional quanto interespecífico, com larvas de anuros (Van Buskirk, 2002; Lind e Johansson, 2007), de que a heterogeneidade ambiental é correlacionada com o grau de plasticidade fenotípica. Lind e Johansson (2007) trabalharam com 14 populações de *Rana temporaria* distribuídas em diferentes ilhas na Suécia, que diferiam na disponibilidade de habitats quanto à permanência (duração antes de secarem). Os autores encontraram uma correlação positiva entre a plasticidade no tempo de desenvolvimento das larvas e a variação de regimes de permanência (risco de secagem) dos habitats de uma mesma ilha. Van Buskirk (2002) estudou a plasticidade morfológica e comportamental em 16 espécies de anuros diante de dois ambientes distintos: presença ou ausência de predador (larva de libélula). As espécies diferiam no uso de habitats, sendo mais ou menos permanentes, e portanto com mais ou menos predadores. Ele utilizou estatística filogenética para análise dos resultados e mostrou que maiores variações na predação dos ambientes das espécies (ou seja, ambientes com alta diversidade de permanência de habitats) foram acompanhadas de aumentos evolutivos na plasticidade de resposta à predação. Esses estudos indicam que a plasticidade fenotípica pode evoluir como resposta à heterogeneidade ambiental.

3. Sobrevivência

R. ornata parece ser mais sensível à morte nos estágios mais iniciais de desenvolvimento, apresentando queda na sobrevivência cumulativa logo no início do

experimento de campo, enquanto *R. icterica* e *R. granulosa* apresentaram uma queda mais gradual na sobrevivência. É possível que essas últimas espécies sofram com a exposição mais prolongada a possíveis fatores de morte, enquanto *R. ornata* sofre já com a exposição aguda. Esse argumento parece bastante plausível para *R. granulosa*, pois o regime térmico obtido nas gaiolas distribuídas no campo foram similares aos de poças temporárias, que apresentam maior risco de picos elevados de temperatura. Os máximos de temperatura nessas gaiolas chegaram a 39,5°C/40 °C, temperaturas bastante elevadas. Apesar disso, a sobrevivência das larvas de *R. granulosa* por 2/3 do experimento foi de aproximadamente 90%, havendo quedas somente bem ao final. Isso mostra que as larvas toleraram altas temperaturas por relativamente um longo tempo de desenvolvimento, mas que talvez essa exposição crônica as tenha fragilizado ou que os estágios mais tardios (acima de Gosner 41) tenham sido mais sensíveis a altas temperaturas, como já reportado em algumas espécies de bufonídeos (Sherman, 1979; Floyd, 1982).

O padrão de sobrevivência ao longo da ontogenia das larvas de *R. ornata* em laboratório foi similar ao do campo. No experimento de desenvolvimento, houve maior mortalidade nos regimes térmicos mais frios no início do desenvolvimento, ao redor do décimo dia. Porém, esse padrão não se repetiu para os regimes mais quentes, nos quais a morte das larvas de *R. ornata* foi menor em geral e mais gradual. A maior sobrevivência nos regimes mais quentes, que são incomuns na floresta atlântica, foi inesperada. A alta sobrevivência em laboratório das larvas de *R. icterica* tanto nos regimes mais frios quanto mais quentes também foi inesperada, apesar de em campo a sobrevivência em distintos microhabitats de Boracéia não ter sido diferente. Esse resultado mostra que as espécies de floresta atlântica sobrevivem bem em novas ou raras condições de temperatura, como os regimes típicos da caatinga. Como detectamos alta sobrevivência em regimes mais quentes para as três espécies, é possível que essa variável não limite a permanência de espécies na caatinga, ao menos na fase larval. Contudo, quanto às larvas das espécies de floresta, um possível limite da sobrevivência em altas temperaturas pode existir, uma vez que no experimento de desenvolvimento não foi possível submeter as larvas a temperaturas tão elevadas quanto 40°C, mais comuns na caatinga.

4. Normas de reação bivariadas das espécies de floresta atlântica

Os tratamentos impostos às larvas de *R. ornata* e *R. icterica* foram efetivos em deflagrar distintos padrões de relação entre as variáveis taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento e massa na metamorfose. A alteração dos padrões se deu especialmente devido aos efeitos suscitados pelas distintas modas de temperatura, que foi a grande diferença observada entre os microhabitats de Boracéia e S. Miguel. Essas relações entre variáveis dependentes podem ser consideradas como normas de reação bivariadas e analisadas dessa forma quanto à plasticidade.

A taxa de crescimento a 27°C mudou mais com o tempo de desenvolvimento do que a 20°C. Isso significa que a sensibilidade térmica das larvas na moda mais quente é maior, e que a relação entre taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento é temperatura-dependente. Esse resultado está de acordo com os resultados de Smith-Gill e Berven (1979) para *Rana pipiens*, nas correlações entre tempo de desenvolvimento e taxa de crescimento a 18°C, 23°C e 28°C (Figura 4 de Smith-Gill e Berven, 1979). Apesar da correlação a 18°C não ter sido significativa, seu padrão foi inverso quando comparado a 23°C e 28°C, sendo positivo na primeira temperatura (ou seja, taxas de crescimento maiores foram acompanhadas de tempos de desenvolvimento maiores) e negativo nas duas outras. Portanto, uma diferença entre 5°C e 10°C na temperatura de desenvolvimento das larvas pode causar uma alteração de sensibilidade térmica das mesmas ou até mesmo uma inversão nos padrões de normas bivariadas de taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento, assim como visto por Smith-Gill e Berven (1979).

As correlações negativas que nós obtivemos para essas normas (ou seja, quanto mais rápido o crescimento, menos tempo de desenvolvimento) estão de acordo com os resultados de Newman (1989) para *Scaphiopus couchii*, que desenvolveram em menor densidade ou maior disponibilidade de comida, e apresentaram desenvolvimento mais rápido junto de crescimento mais rápido. Contudo, em *Discoglossus galgonoi*, Alvarez e Nicieza (2002) não encontraram períodos larvais mais curtos diante de crescimento mais rápido, associado com uma dieta protéica diante de uma herbívora. Percebemos então que, para alguns fatores ecológicos como densidade e quantidade de alimento, assim como para algumas temperaturas, o desenvolvimento mais rápido está correlacionado com um crescimento mais rápido. Mas, para outros fatores, como a qualidade da dieta, esse padrão não é visto.

A correlação positiva entre massa na metamorfose e tempo de desenvolvimento encontrada na moda de 20°C é um resultado previsto pelas teorias ecológicas relacionadas com massa na metamorfose. A teoria de Wilbur e Collins (1973) prevê que larvas de crescimento mais lento (condizente com as menores taxas de crescimento que obtivemos a 20°C) permanecerão mais tempo no habitat aquático até atingirem sua massa ótima na metamorfose (uma massa maior). Werner (1986), que expandiu a teoria de Wilbur e Collins (1973) incluindo um compromisso entre mortalidade e taxa de crescimento, previu que a extensão do tempo de desenvolvimento no habitat aquático seria vantajosa enquanto a oportunidade de crescer superasse o risco de mortalidade. Finalmente, Rudolf e Rödel (2007) previram que em habitats permanentes, o risco de mortalidade não varia com o tempo (pois não há risco de secagem do habitat), não havendo portanto uma seleção para aceleração da metamorfose. Deste modo, a resposta na moda mais fria está de acordo com todas as teorias ecológicas.

O padrão inverso obtido para a norma bivariada de massa na metamorfose e tempo de desenvolvimento na moda de 27°C mostra que essa relação também é temperatura-dependente. A correlação negativa indica que prolongar o tempo de desenvolvimento não resulta em maior massa. Observando-se as normas de massa na metamorfose e taxa de crescimento, que são correlações positivas para ambas as modas, notamos que as larvas a 27°C que atingiram a mesma faixa de massa que as larvas a 20°C (entre 0,20 e 0,30g) foram as que atingiram taxas de crescimento superiores (entre 20 e 30 mg/dia). Desse modo, apesar dessas larvas terem reduzido seu tempo de desenvolvimento diante das larvas a 20°C, a maior aceleração nas taxas de crescimento compensou a massa na metamorfose. Porém, existiram larvas na moda mais quente que obtiveram as mesmas taxas de crescimento que as larvas a 20°C (entre 5 e 20 mg/dia), mas também reduziram o tempo de desenvolvimento. Ou seja, a aceleração do desenvolvimento não foi acompanhada na mesma proporção por uma aceleração do crescimento, e assim a massa na metamorfose ficou menor. Essas larvas a 27°C que possuíram massa menor, foram mais sensíveis à temperatura no tempo de desenvolvimento que na taxa de crescimento. Esse resultado é condizente com a regra de Smith-Gill e Berven (1979), de que a sensibilidade térmica da taxa de diferenciação é maior que a de crescimento. No entanto, essa regra não foi válida para todas as

larvas, uma vez que observamos aceleração do crescimento e do desenvolvimento na mesma proporção.

O grande resultado dessas normas bivariadas é que existem diferenças individuais na sensibilidade térmica das larvas. A regulação do desenvolvimento diante da temperatura pode ser modulada no nível individual, indicando que existe substrato para atuação da seleção natural na sensibilidade térmica individual. Esse resultado suporta os achados de Berven, Gill *et al.* 1979, que encontrou diferentes sensibilidades térmicas do desenvolvimento nas populações de planície e montanha de *Rana clamitans*, no sentido de mostrar que existem diferenças individuais na sensibilidade das larvas capazes de serem selecionadas em distintos ambientes, e resultarem em populações de sensibilidades distintas.

5. Efeitos da moda e da variação térmica nas espécies de floresta atlântica

Não encontramos variação nas respostas das famílias de *R. ornata* perante os efeitos da temperatura no experimento de desenvolvimento, já que não houve nenhum efeito significativo desse fator nas variáveis analisadas, nem interação desse fator com a moda ou com a variação térmica, indicando que não observamos variação genética entre famílias para a plasticidade. Esse tipo de interação é importante para a possibilidade de evolução da plasticidade (Newman, 1992; Dewitt, Sih *et al.*, 1998; Relyea, 2002), porém como encontramos variação individual nas respostas à temperatura, acreditamos que essa possibilidade realmente exista nas larvas de *R. ornata*. Variação genética na plasticidade fenotípica em famílias de larvas de anuros foi encontrada para *Scaphiopus couchii* (Newman, 1988) e para *Rana temporaria* (Olsson e Uller, 2002).

Os efeitos isolados de aumentar a moda de temperatura levando ao aumento das taxas de crescimento, redução dos tempos de desenvolvimento e redução das massas na metamorfose (o último somente para *R. ornata*) eram esperados e condizem com vários outros estudos de temperatura e desenvolvimento em larvas de anuros (por exemplo, Smith-Gill e Berven, 1979; Blouin, 1992; Morand, Joly *et al.*, 1997; Alvarez e Nieceza, 2002; Buchholz e Hayes, 2002). A espécie *Hyla squirella*, estudada por Blouin (1992), também não apresentou massa reduzida na temperatura de 30°C em comparação com a de 25°C (apesar de seu tempo de desenvolvimento ter sido menor a

30°C), assim como *R. icterica*, quando comparamos a moda de 20°C com 27°C. Provavelmente o aumento da taxa de crescimento de *R. icterica* compensou a redução do tempo de desenvolvimento, enquanto isso não ocorreu com *R. ornata*. Esse resultado aponta para uma sensibilidade térmica do crescimento similar ao do desenvolvimento em *R. icterica*, sendo um padrão diferente do observado por Smith-Gill e Berven (1979).

Os efeitos isolados da variação térmica revelaram que *R. ornata* é mais sensível que *R. icterica*, já que nesta última espécie não houve nenhum efeito da variação da temperatura. Em *R. ornata*, a maior variação térmica causou redução da taxa de crescimento com a conseqüente redução da massa na metamorfose. Esses resultados diferem parcialmente do que foi encontrado em larvas de *Limnodynastes peronii* que desenvolveram em um regime de média de 24°C constante e outro de mesma média, mas que variou 14°C no dia (Niehaus, Wilson *et al.*, 2006). As larvas de *L. peronii* apresentaram maior taxa média de crescimento e menor tempo médio de desenvolvimento e massa na metamorfose no regime de variação térmica. Ou seja, os efeitos da variação térmica nas taxas de crescimento foram opostos nas duas espécies e similares na massa na metamorfose. Niehaus, Wilson *et al.* (2006) afirmaram que os efeitos da variação térmica foram os mesmos dos efeitos de altas temperaturas constantes reportados na literatura, e inclusive vistos nesse estudo para a moda de 27°C. As larvas aceleraram a metamorfose, mas não aceleraram as taxas de crescimento na mesma proporção, havendo uma redução da massa quando comparados com o regime constante.

Sob uma perspectiva fisiológica, a queda observada nas taxas de crescimento em *R. ornata* diante de altas variações térmicas é intrigante. A grande diferença entre os regimes constantes e os regimes variáveis, dentro de uma mesma moda, foi a magnitude dos picos de temperatura, pois a mínima diferiu muito pouco das modas (18°C para 20°C nos frios e 25°C para 27°C nos quentes). Em temperaturas mais altas o metabolismo basal dos ectotermos é maior, e menos energia é canalizada para o crescimento (Hochachka e Somero, 2002). Porém, se as larvas aumentam sua captação e assimilação de alimento, o crescimento ainda poderia ser mantido inalterado. Aparentemente, as larvas de *R. ornata* em regimes variáveis não aumentam seu ganho de energia na mesma proporção que aumentam seu metabolismo diante de temperaturas mais altas, gerando um compromisso de alocação. Uma maior parte da

energia assimilada foi alocada para a manutenção do metabolismo, restando menos energia para o crescimento. Os compromissos ecológicos, como de alocação, aquisição e generalista-especialista, foram considerados por Angilletta, Wilson *et al.* (2003) como moduladores da evolução de normas de reação. O compromisso de alocação pode ter ocorrido devido a uma menor captação de alimento ou a uma menor assimilação da energia, se a digestão e a absorção forem menores em maiores picos de temperatura. Esses processos fisiológicos normalmente apresentam uma faixa de temperatura ótima, que é determinada pelos ótimos de atividade enzimática (Hochachka e Somero, 2002). Com o compromisso, as larvas de *R. ornata* cresceram menos e acabaram por ter uma massa menor nos regimes mais variáveis.

As diferenças ecológicas entre *R. ornata*, *R. icterica* e *L. peronii* também podem ter contribuído para o efeito distinto da variação térmica nessas espécies. As larvas das três espécies ocorrem tanto em habitats aquáticos mais permanentes quanto mais efêmeros, contudo Niehaus, Wilson *et al.* (2006) justificaram as respostas das larvas de *L. peronii* de acelerar mais o desenvolvimento pelo fato de serem sujeitas ao risco de secagem de habitats efêmeros, os quais apresentam alta variação térmica diária. Se seguirmos com essa linha de raciocínio, poderíamos sugerir que as larvas de *R. ornata* e *R. icterica* desenvolvem-se em habitats efêmeros em menor frequência que as larvas de *L. peronii*, não apresentando a resposta típica ao risco de secagem, descrita inicialmente por Newman (1989) em *Scaphiopus couchii*. Essa resposta, de acelerar o desenvolvimento, foi considerada como adaptativa, pois evita a morte no habitat aquático (Newman, 1992). Podemos pensar, então, que enquanto as larvas de *R. icterica* simplesmente não apresentam sensibilidade à variação térmica por não desenvolverem frequentemente em habitats efêmeros, as larvas de *R. ornata* apresentam uma resposta não-adaptativa pela mesma razão. Nesse caso, a sua sensibilidade à variação térmica não teria sido selecionada, e poderia ser uma manifestação de restrição fisiológica.

Além dos efeitos isolados da moda e variação de temperatura, efeitos de interação entre essas duas variáveis foram encontrados, indicando que o efeito da moda depende da magnitude de variação térmica. Nos regimes variáveis as diferenças na massa na metamorfose entre as duas modas diminuíram, assim como as diferenças na taxa média de crescimento e no tempo médio de desenvolvimento também diminuíram, especialmente à variação de 8°C. Isso sugere que os maiores picos de

temperatura dos regimes variáveis alteram a fisiologia das larvas, principalmente na moda mais fria, reduzindo mais o tempo de desenvolvimento do que acelerando a taxa de crescimento, resultando em uma massa na metamorfose menor e mais similar à moda mais quente.

6. Normas de reação de variação térmica das espécies de floresta atlântica

A análise separada dos efeitos da moda, da variação de temperatura e da interação entre esses fatores tem um caráter mais fisiológico, e em segundo plano, ecológico. É uma apreciação dos possíveis mecanismos fisiológicos e pressões ecológicas que podem estar atuando para a resposta das espécies. Esses mecanismos contribuem para a determinação da forma de uma norma de reação, especialmente se a norma for fruto de sensibilidade alélica. A análise das formas das normas de reação de variação térmica é mais direta em acessar a plasticidade fenotípica das larvas e levantar questões evolutivas a serem discutidas, como benefícios ou custos da plasticidade e/ou da canalização e as diferenças de aptidão das espécies diante de variação ambiental rara ou nova.

A intenção principal do experimento de desenvolvimento com as espécies da floresta atlântica foi de comparar suas respostas nos regimes térmicos considerados como típicos da floresta (os de moda de 20°C) e nos regimes considerados típicos da caatinga (os de moda 27°C), na tentativa de simular a mudança ambiental que se deu na caatinga. As condições da caatinga foram tidas como novas ou raras para as espécies de floresta, e segundo a teoria de normas de reação ocultas (explicitada em Schlichting, 2008), fenótipos novos poderiam ser detectados para as espécies, indicando se a aptidão seria a mesma que os fenótipos mais comumente expressos na natureza.

A variável massa na metamorfose é freqüentemente utilizada como uma medida de aptidão em anfíbios anuros, uma vez que diversos estudos relacionam uma maior massa (ou maior tamanho) com maior sobrevivência (Berven, 1990; Morey e Reznick, 2001; Altwegg e Reyer, 2003; Vonesh, 2005) e maior sucesso reprodutivo (Berven, 1981). Nesse estudo, com *R. granulosa*, obtivemos uma relação positiva entre massa da fêmea e massa do cordão de ovos, indicando que a massa pode ser analisada como uma medida indireta de sucesso reprodutivo. Infelizmente não conseguimos construir

essa relação para as espécies da floresta atlântica, mas como o parentesco entre as três espécies de *Rhinella* é alto, é provável que a relação seja válida também para *R. ornata* e *R. icterica*.

As formas das normas de reação de variação térmica foram bastante similares entre as duas espécies, sendo condizente com seu alto parentesco filogenético e com os resultados de outros estudos com espécies aparentadas (por exemplo, Blouin, 1992; Morey e Reznick, 2004). Entretanto, as normas não foram idênticas: os regimes térmicos nos quais as larvas de *R. ornata* e *R. icterica* apresentaram otimização simultânea da taxa média de crescimento e do tempo médio de desenvolvimento não foram os mesmos. *R. ornata* obteve maior crescimento e menor tempo de desenvolvimento no regime quente constante e *R. icterica* obteve o mesmo no regime quente de variação térmica de 4°C. Apesar dessa diferença, o regime térmico de maior aptidão (de maior massa) foi o mesmo para ambas as espécies, o de 20°C constante. É interessante notar que o fenótipo de maior aptidão não foi obtido nos regimes que otimizaram as variáveis de desenvolvimento, mas sim no regime que suscitou maior crescimento total das larvas devido ao longo tempo de desenvolvimento apresentado por estas. O fato das larvas terem maior aptidão em um regime comum da floresta atlântica aponta para um bom ajuste entre fenótipo e ambiente nessas espécies. Essa resposta é típica de larvas que freqüentam habitats permanentes, sem restrição de tempo e de baixa pressão de predação (Wilbur e Collins, 1973; Werner, 1986; Rudolf e Rödel, 2007).

Outra semelhança entre as normas de massa na metamorfose das duas espécies que chama muita atenção é a forte canalização da massa em torno de 0,25 g ante uma variação de regimes térmicos bastante grande. Essa canalização é resultado da interação entre moda e variação de temperatura, já que os maiores picos de temperatura nos regimes variáveis de moda 20°C culminaram em uma massa menor que a 20°C constante, igualando a massa na metamorfose nos regimes de modas 20°C e 27°C. Essa queda da massa indica que as larvas perderam aptidão com o efeito da variação térmica, caracterizando, portanto, um custo de plasticidade fenotípica quando comparamos com a ausência de variação. Essa queda da massa está relacionada com a regra de Smith-Gill e Berven (1979), de maior sensibilidade térmica do desenvolvimento que do crescimento.

O custo de plasticidade descrito aqui é distinto do custo de plasticidade descrito por DeWitt, Sih *et al.* (1998). Segundo esses autores, o custo de um organismo plástico deve ser comparado ao de um organismo não-plástico, sendo que o custo é medido como uma perda de aptidão, ou seja, a apresentação de uma plasticidade não-adaptativa. Acreditamos que comparar a aptidão de fenótipos em diferentes ambientes também pode esclarecer se a plasticidade trouxe um benefício ou um custo. Parece, portanto, que as espécies de floresta atlântica, sendo sensíveis ao efeito da interação entre moda e variação térmica, apresentaram plasticidade não-adaptativa e perderam aptidão. Newman (1998) argumentou que a interação entre fatores ambientais poderia limitar as condições nas quais a resposta plástica adaptativa pudesse ocorrer, exatamente como visto empiricamente nesse estudo.

Quando focamos na resposta das larvas somente nos regimes térmicos de moda 27°C, percebemos que não houve uma queda da massa do regime constante para o variável em parte da norma de *R. ornata* e em toda a norma de *R. icterica*. Ou seja, a canalização da massa nessa porção da norma significou manutenção da aptidão perante variação térmica. Segundo (Waddington, 1960), a canalização resulta da eliminação por seleção natural de alelos que sensibilizem o sistema de desenvolvimento à variação ambiental estressante. A definição de um ambiente estressante pode ser dada de mais de uma maneira. Em diversos estudos com larvas de anuros, estresse é implicitamente definido como uma condição ambiental que leva à perda de aptidão. Exemplos dessas condições são altas densidades, risco de secagem do habitat aquático, presença de predadores, entre outros (por exemplo, Newman, 1989; Steiner e Van Buskirk, 2008). Entretanto, seguindo a teoria de normas de reação, um ambiente estressante é aquele de baixa frequência de ocorrência, não exercendo uma pressão seletiva significativa sob a população (Schlichting e Pigliucci, 1995) ou um ambiente nunca encontrado antes pela população, impondo um desafio à manutenção da homeostase (Ghalambor, McKay *et al.*, 2007). Se utilizarmos esta última definição, realmente podemos denotar os regimes mais quentes como estressantes para as larvas de *R. ornata* e *R. icterica*, pois são regimes típicos da caatinga.

O argumento de Waddington (1960) poderia ser aplicado para a canalização da massa vista nas espécies da floresta se alelos que determinam a sensibilidade diferencial da diferenciação e do crescimento (seguindo a regra de Smith-Gill e Berven, 1979) tivessem sido eliminados das suas populações, resultando em uma insensibilidade

térmica da massa na metamorfose. Porém, para que essa sugestão seja viável, alelos distintos teriam que ser expressos em regimes mais frios e mais quentes. Se fossem os mesmos alelos, a eliminação destes também conferiria insensibilidade da massa nos regimes de 20°C de moda. Se são alelos distintos expressos nos regimes de distintas modas, a resposta das espécies poderia ser denominada de conversão do desenvolvimento, em vez de modulação fenotípica, havendo um limiar de temperatura para a expressão de um conjunto de alelos ou a expressão do outro conjunto. Uma explicação alternativa é que os alelos que conferem a sensibilidade diferencial da diferenciação e do crescimento nos regimes frios não são expressos nos regimes quentes. Essas considerações tornam-se de fato relevantes quando verificamos que a evolução da sensibilidade térmica é teoricamente prevista (Huey e Kingsolver, 1989) e empiricamente comprovada (por exemplo, Berven, Gill *et al.*, 1979; Olsson e Uller, 2002; Gomez-Mestre e Buchholz, 2006), além de termos observado nas espécies *R. ornata* e *R. icterica* variação individual na sensibilidade térmica.

Custos de plasticidade (por exemplo, Newman 1992; DeWitt, Sih *et al.* 1998; Relyea, 2002) começaram a ser investigados recentemente em estudos com larvas de anuros. Até o momento, poucos estudos encontraram esses custos (revisto por Van Buskirk e Steiner, 2009), porém Lind e Johansson (2009) ressaltaram que isso pode ser decorrente da investigação de populações de baixo grau de plasticidade, se os custos estão associados com populações de alta plasticidade. Esses autores encontraram um custo de plasticidade, ante um experimento de redução do volume de água, em populações de *Rana temporaria* de alta plasticidade no tempo de desenvolvimento. As populações mais plásticas tiveram menor massa que as menos plásticas. Esse argumento também se aplica às espécies de floresta atlântica que nós estudamos, pois a plasticidade tanto no tempo de desenvolvimento quanto nas taxas de crescimento foram bastante altas e encontramos um custo de plasticidade associado à sensibilidade à interação entre moda e variação da temperatura.

Estudos que reportam custos de canalização são ainda mais recentes na literatura de larvas de anuros (por exemplo, Steiner e Van Buskirk 2008; Lind e Johansson 2009). Steiner e Van Buskirk (2008) determinaram a plasticidade de vários caracteres em larvas de *Rana temporaria* em resposta à presença de predadores. Para se estimar possíveis custos de plasticidade e de canalização, os autores submeteram larvas de diferentes graus de plasticidade, diante da presença de predador, a um

experimento de competição em diferentes densidades de larvas. Um custo de canalização foi detectado em larvas de baixa plasticidade de morfologia da cauda, uma vez que estas desempenharam pior na competição com larvas de alta plasticidade. Lind e Johansson (2009) além de detectarem custos de plasticidade, encontraram um custo de canalização nas populações de *Rana temporaria* de baixa plasticidade no tempo de desenvolvimento, novamente no regime de redução do volume de água, que obtiveram menor massa que as larvas mais plásticas.

Nas nossas populações de *R. ornata* e *R. icterica*, nós detectamos na verdade um ganho de canalização nos regimes típicos da caatinga para parte da norma, em *R. ornata*, e para toda a norma em *R. icterica*. O ganho de canalização pode ser considerado como um aspecto novo da norma de reação das espécies de floresta quando exposta a variação ambiental nova. Entretanto, se considerarmos que os regimes típicos da caatinga não são estressantes para as espécies da floresta, uma vez que a aptidão não é perdida, o argumento de Waddington (1960) não se aplicaria mais. Um outro argumento, de que a canalização corresponde a faixa ambiental historicamente mais comum para as espécies (Lewontin, 1974) faria mais sentido nesse caso. Apesar dos regimes típicos da caatinga não serem encontrados no habitat atual das espécies de floresta, isso não impede que tenham sido comuns no passado, pensando na linhagem das espécies. Se este for o caso, as espécies retiveram em sua norma de reação uma parte de sua história natural, e os regimes mais frios poderiam então ser considerados como variação ambiental nova. A plasticidade encontrada no regime de 20°C constante passaria então a ser considerada como adaptativa, pois aumenta a aptidão.

Contudo, o fato da canalização em *R. ornata* ter sido perdida no regime mais quente de maior variação térmica, enfraquece a idéia de que os regimes da caatinga eram comuns na linhagem ancestral das espécies. Nesse regime, as larvas de *R. ornata* apresentaram plasticidade não-adaptativa, com perda de massa, e portanto de aptidão. Essa resposta está relacionada com o fato dessa espécie ter sensibilidade tanto à interação entre moda e variação de temperatura, quanto à própria variação térmica isolada, diferente da insensibilidade de *R. icterica*. Essa plasticidade não-adaptativa de *R. ornata* está relacionada com o compromisso de alocação destacado no item anterior. Portanto, a nossa concepção inicial de que os regimes da caatinga são uma

variação nova para as espécies de floresta tem mais suporte, ainda mais se seguirmos a teoria de normas de reação sobre o que significa um ambiente estressante.

7. Normas de reação de Temperatura Crítica Máxima

R. granulosa possui maior tolerância térmica em ambas as temperaturas de aclimação testadas, todavia essa maior tolerância não seu deu devido a uma maior plasticidade da norma de reação, e sim devido a um deslocamento da norma para temperaturas críticas mais altas. Aparentemente, a maior tolerância de *R. granulosa* é geneticamente determinada, sugerindo uma adaptação local. A sugestão de adaptação é fortalecida se considerarmos que a norma de tolerância térmica de *R. granulosa* anterior à aridificação da caatinga era similar a das espécies da floresta atlântica.

Poderíamos considerar que a maior tolerância das larvas de *R. granulosa* é correlacionada com maior expressão de chaperonas (proteínas Hsp), já que estas proteínas sabidamente são induzidas por altas temperaturas (Feder e Hofmann, 1999; Roberts e Feder, 2000). Porém, um estudo com três populações de *Rana temporaria*, distribuídas ao longo de um gradiente latitudinal, somente detectou indução da expressão de Hsp70 perante altas temperaturas em uma população (Sorensen, Pekkonen *et al.*, 2009). Os autores sugeriram que a falta de indução da Hsp70 em outras populações poderia ser fruto de um alto custo para sua expressão, especialmente na população mais ao nordeste, que habita um ambiente limitante para o crescimento. A indução de chaperonas como causa de maior tolerância térmica na natureza é ainda uma questão não resolvida em anfíbios anuros.

Todas as espécies apresentaram a resposta plástica de aclimação da tolerância, sendo que *R. ornata* foi a espécie mais plástica. Encontramos, desse modo, um benefício da aclimação térmica nas três espécies, pois acarretou em maior tolerância térmica. Esse resultado pode ser considerado de acordo com a “Hipótese de aclimação benéfica”, assim denominada por Leroi, Bennett *et al.*, (1994), que postula que a aclimação a um ambiente particular promove uma vantagem de desempenho em comparação com um organismo que não consegue se aclimatar. A vantagem de desempenho no caso das espécies de *Rhinella* seria uma maior sobrevivência.

A maior plasticidade vista em *R. ornata* diante de *R. icterica* ocorreu porque a primeira espécie tolera uma temperatura menor quando aclimatada a 20°C.

Considerando as épocas reprodutivas das duas espécies, notamos que *R. icterica* estende sua reprodução desde o inverno até o verão, sofrendo uma variação sazonal dos máximos de temperatura bastante alta. Apesar dessa maior variação não ter se refletido em uma maior plasticidade, a maior tolerância a 20°C indica que essa espécie ocupa microhabitats que apresentam temperaturas máximas mais altas, comuns no verão. *R. ornata* reproduz somente até novembro, não passando pela variação sazonal do verão. Isso sugere que seus microhabitats frequentes de desenvolvimento não atingem temperaturas tão altas quanto os de *R. icterica*. Uma alternativa a essa explicação poderia ser simplesmente que as duas espécies selecionam microhabitats distintos quanto aos picos de temperatura. O fato de *R. ornata* ser mais sensível que *R. icterica* à variação térmica, perdendo aptidão, sugere que essa espécie não selecione microhabitats de picos mais altos de temperatura, que correlacionam-se com maior amplitude térmica.

A diferença entre TCM_{ax} e T_{max} ambiental pode ser denominada como tolerância ao aquecimento (“warming tolerance”), apesar de originalmente ter sido definida como a diferença entre TCM_{ax} e temperatura média ambiental (Deutsch, Tewksbury *et al.*, 2008). Entretanto, seguindo a opinião de outros autores, nós achamos que as temperaturas máximas são muito mais relevantes em determinar os TCM_{ax} que as médias ambientais (por exemplo, Chown, Hoffmann *et al.*, no prelo). Se considerarmos como T_{max} a temperatura máxima média do microhabitat mais quente em Boracéia (“Pedreira” 27,1°C) e em S. Miguel (“Poça rochas” 39,4°C), e calcularmos a tolerância de aquecimento diante da TCM_{ax} a 30°C de aclimação, teremos os valores 15,4°C para as espécies de floresta, e 5,0°C para *R. granulosa*. Ou seja, a tolerância ao aquecimento das espécies de floresta é três vezes maior que de *R. granulosa*. Isso indica que esta última espécie corre um risco muito mais alto de mortalidade caso uma temperatura mais elevada que a média máxima ocorra. Portanto, as condições de temperatura da caatinga são de alto risco para *R. granulosa*, mas as larvas dessa espécie conseguem se manter nesse bioma.

O alto valor da tolerância ao aquecimento encontrado para as espécies de floresta sugere que em sua história evolutiva episódios raros de temperaturas extremamente altas ocorreram, selecionando indivíduos de maior tolerância. Se as espécies de floresta fossem submetidas ao máximo médio de temperatura da caatinga, teriam uma tolerância ao aquecimento de apenas 3,1°C, sendo as condições da caatinga

de risco extremamente alto de morte para essas espécies. O fato da aridificação da caatinga ter sido gradual pode ter contribuído para o aumento da tolerância ao aquecimento de *R. granulosa* em comparação com *R. ornata* e *R. icterica*, em condições de temperatura típicas de caatinga.

8. Especulações sobre a plasticidade de desenvolvimento de *R. granulosa* e Considerações finais

O ganho de canalização que encontramos somente na porção da norma de reação dos regimes típicos da caatinga, especialmente em *R. icterica*, que manteve sua aptidão até no regime de maior pico de temperatura, nos fez especular que a expressão de uma norma como essa na caatinga poderia ser vantajosa. Isso porque diante de picos maiores de temperatura, a massa seria mantida. Essa resposta foge à regra de Smith-Gill e Berven (1979) de que a sensibilidade à temperatura da diferenciação é maior que do crescimento, o que culminaria em perda de massa a maiores temperaturas. *R. icterica* fugiu à essa regra porque em regimes de moda 27°C, suas larvas possuem a mesma sensibilidade da diferenciação e do crescimento, mantendo a massa na metamorfose. Sugerimos que o padrão de sensibilidade térmica distinto entre regimes mais frios e mais quentes se deve à expressão diferencial de alelos nos regimes frios e nos quentes que nós testamos. A possível não expressão dos alelos nos regimes quentes pode estar relacionada com a baixa frequência desses regimes na floresta atlântica, não havendo uma pressão seletiva constante para que esses alelos sejam expressos.

A insensibilidade térmica da massa na metamorfose aos regimes de caatinga junto da alta plasticidade no tempo de desenvolvimento, sendo as espécies da floresta capazes de reduzir esse tempo em até três vezes, são características que poderiam ser selecionadas e aumentadas na caatinga, se a espécie *R. granulosa* apresentava uma norma de reação de desenvolvimento similar às espécies de floresta. Os microhabitats desse bioma são temporários, e portanto apresentam uma restrição de tempo. Porém, a aceleração do desenvolvimento não resultaria em uma perda de massa se os indivíduos selecionados na caatinga fossem os que não seguem a regra de Smith-Gill e Berven (1979), possuindo uma sensibilidade térmica da diferenciação similar ao do crescimento.

A idéia de fixação do tempo de desenvolvimento, para o mais curto possível, em espécies típicas de habitats aquáticos efêmeros é teoricamente prevista por alguns autores (por exemplo, Alvarez e Nicieza, 2002; Rudolf e Rödel, 2006) e empiricamente comprovada em *Scaphiopus* e *Spea* (Morey e Reznick, 2004; Gomez-Mestre e Buchholz, 2006) e em algumas populações de *Rana temporaria* (Lind e Johansson, 2007). A idéia de que essas espécies perderam sua plasticidade no tempo de desenvolvimento diante de seleção forte para desenvolvimento rápido é bastante atraente, e concordante com as idéias de Richards, Bossdorf *et al.* (2006), por exemplo, de que a plasticidade seja vantajosa somente no estágio inicial de invasão (ou manutenção) em um novo ambiente, mas selecionada contra em um estágio posterior. Diante dessas reflexões, um potencial cenário é de que as larvas da espécie *R. granulosa* não apresentariam maior plasticidade de desenvolvimento que as espécies *R. ornata* e *R. icterica* nas condições atuais. Isso foi verificado para a temperatura crítica máxima, sendo esta maior, mas não mais plástica, em *R. granulosa*.

Por fim, é importante ressaltar dois pontos: (1) Esse trabalho é um estudo de caso, pois foi restrito a somente uma população de cada uma das espécies. Por conseguinte, os resultados encontrados não se aplicam necessariamente às espécies como um todo; (2) A grande maioria das teorias e dos estudos com larvas de anfíbios anuros foi conduzida com espécies do hemisfério norte, como as do gênero *Rana* por exemplo, e os padrões descritos não necessariamente se aplicam às espécies que nós estudamos. A descoberta de um padrão distinto da regra de sensibilidade térmica diferencial da diferenciação e do crescimento, reportado por Smith-Gill e Berven (1979), é um exemplo disso. Pode ser que justamente esse novo padrão seja importante para a manutenção de espécies de anuros em um ambiente como a caatinga.

Conclusões

1. A heterogeneidade de temperatura dos microhabitats larvais da floresta atlântica é maior que a da caatinga, especialmente no aspecto temporal;
2. A heterogeneidade de variação térmica dos microhabitats larvais suscita plasticidade na massa na metamorfose das larvas;
3. A sobrevivência das larvas em regimes térmicos mais quentes não parece limitar a manutenção das espécies nessas condições;
4. Existe variação individual na sensibilidade térmica das larvas de *R. ornata* e *R. icterica* quanto aos processos de desenvolvimento;
5. A regra de Smith-Gill e Berven (1979) de sensibilidade térmica diferencial da diferenciação e do crescimento não se aplica a todos os indivíduos larvais de *R. ornata* e *R. icterica*;
6. *R. ornata* é mais sensível à variação térmica que *R. icterica*, perdendo massa em maior variação da temperatura devido a um possível compromisso de alocação;
7. Existe interação entre moda e variação da temperatura nas variáveis de desenvolvimento;

8. Foram detectados um custo de plasticidade nos regimes térmicos frios e um ganho de canalização da massa na metamorfose nos regimes térmicos quentes nas larvas de *R. ornata* e *R. icterica*;
9. A canalização da massa das larvas de *R. ornata* e *R. icterica* nos regimes típicos da caatinga é resultado da fuga da regra de Smith-Gill e Berven (1979);
10. *R. granulosa* apresenta maior Temperatura Crítica Máxima e menor tolerância ao aquecimento que *R. ornata* e *R. icterica*;
11. Em conjunto, os resultados obtidos não corroboraram a hipótese de que a espécie da caatinga é mais plástica que as espécies de floresta.

Resumo

A manutenção de espécies de anfíbios anuros na caatinga, um bioma que sofre um processo de aridificação, suscita perguntas sobre quais aspectos fisiológicos e evolutivos estão envolvidos nesse contexto. O argumento de que a plasticidade fenotípica permite que uma população sobreviva perante mudanças ambientais parece uma explicação plausível. A temperatura e sua variação foram eleitas como representativas da alteração ambiental, tendo como referência os valores correspondentes da floresta atlântica. Essa comparação fundamentou-se na evidência de que a caatinga assemelhava-se a uma floresta úmida antes da aridificação. Utilizamos como marco teórico um trabalho central de Smith-Gill e Berven (1979), que mostrou que a sensibilidade térmica da diferenciação é maior que do crescimento em larvas de anuros. A hipótese central foi que a plasticidade de desenvolvimento da espécie *Rhinella granulosa*, presente na caatinga, é maior que das espécies *Rhinella ornata* e *Rhinella icterica*, habitantes da floresta atlântica. O método principal foi de comparar normas de reação térmicas de taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento, massa na metamorfose e temperatura crítica máxima (TCMax) das espécies. Para isso, regimes térmicos foram simulados em laboratório a fim de representarem microhabitats típicos da floresta e da caatinga. A interação entre moda e variação da temperatura foi significativa para as espécies *Rhinella ornata* e *Rhinella icterica*. As espécies de floresta foram muito plásticas. Quando submetidas a regimes típicos da caatinga, apresentaram um aumento de duas vezes da taxa média de crescimento e um terço do tempo médio de desenvolvimento, em comparação com regimes de floresta. As larvas apresentaram variação individual de sensibilidade térmica, sendo que uma parte da amostra não seguiu a regra de Smith-Gill e Berven (1979), apresentando sensibilidade da diferenciação similar ao do desenvolvimento. Como consequência, mantiveram sua massa na metamorfose canalizada em 0,25g mesmo diante de maiores picos de temperatura. A TCMax foi maior para *R. granulosa*, porém menos plástica que as espécies de floresta. Os resultados não corroboraram a nossa hipótese, uma vez que as espécies de floresta parecem ser mais plásticas que a espécie da caatinga.

Abstract

The lasting presence of anuran amphibian species in the Caatinga, an environment that has been undergoing a desertification process, raises questions regarding the physiological and evolutionary aspects involved. The argument that phenotypic plasticity allows for the survival of populations in face of environmental changes seems to provide a plausible explanation. Temperature and its variation were elected as representatives of the desertification process. Based on the evidence that the Caatinga was originally a humid forest, correspondent values for the Atlantic forest were used as reference for comparison. The theoretical framework adopted assumes that the thermal sensitivity of differentiation in anuran larvae is higher than growth sensitivity (Smith-Gill and Berven, 1979). Our main hypothesis was that the developmental plasticity of the Caatinga species *Rhinella granulosa* is greater than those of Atlantic forest species *Rhinella ornata* and *Rhinella icterica*. We compared thermal reaction norms of growth rate, development time, metamorphic mass and critical thermal maxima (CTMax) for each species. Larvae were submitted to thermal regimes typical of the Caatinga and the Atlantic forest. A significant interaction between thermal mode and variation was detected for both *Rhinella ornata* and *Rhinella icterica*. Forest species appeared very plastic. When submitted to Caatinga thermal regimes, they displayed double growth rate and a third of development time in comparison to when they were submitted to Atlantic forest thermal regimes. The larvae presented individual variation in thermal sensitivity. Indeed, a fraction of the sample did not follow Smith-Gill and Berven's rule and displayed thermal sensitivity of differentiation similar to growth sensitivity. As a consequence, they maintained their metamorphic mass canalized at 0,25g in face of higher temperatures. Although *Rhinella granulosa*'s CTMax was higher than for the forest species, it presented less plasticity. The results have not supported our hypothesis as the Atlantic forest species seems more plastic than the Caatinga species.

Referências Bibliográficas

Altwegg, R. e H. U. Reyer. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. Evolution, v.57, n.4, Apr, p.872-882. 2003.

Alvarez, D. e A. G. Nicieza. Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. Oecologia, v.131, n.2, Apr, p.186-195. 2002.

Angilletta, M. J., R. S. Wilson, *et al.* Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. Trends in Ecology & Evolution, v.18, n.5, May, p.234-240. 2003.

Arendt, J. D. The cellular basis for phenotypic plasticity of body size in Western Spadefoot toad (*Spea hammondi*) tadpoles: patterns of cell growth and recruitment in response to food and temperature manipulations. Biological Journal of the Linnean Society, v.88, n.3, Jul, p.499-510. 2006.

Baldiçsera JR., F. A., U. Caramaschi *et al.* Review of the *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, v.62, n.3, Jul/Set, p.255-282. 2004.

Baldwin, J. M. A new factor in evolution. American Naturalist, v.30, p.354-451. 1896.

Bellis, E. D. The Influence of Humidity on Wood Frog Activity. American Midland Naturalist, v.68, p.139-148. 1962.

Bertoluci, J. e M. T. Rodrigues. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boraceia, Southeastern Brazil. Amphibia-Reptilia, v.23, n.2, p.161-167. 2002.

Berven, K. Heritable and Environmental Components of Development and Reproduction in Ranid Frogs. American Zoologist, v.21, n.4, p.980-980. 1981.

Berven, K. A. The Genetic-Basis of Altitudinal Variation in the Wood Frog *Rana-Sylvatica* .1. An Experimental-Analysis of Life-History Traits. Evolution, v.36, n.5, p.962-983. 1982.

_____. Factors Affecting Population Fluctuations in Larval and Adult Stages of the Wood Frog (*Rana-Sylvatica*). Ecology, v.71, n.4, Aug, p.1599-1608. 1990.

Berven, K. A., D. E. Gill, *et al.* Countergradient Selection in the Green Frog, *Rana-Clamitans*. Evolution, v.33, n.2, p.609-623. 1979.

Bigarella, J. J. e D. de Andrade-Lima. Paleoenviromental changes in Brazil. In: Prance, G. T. (ed). Biological diversification in the tropics. Columbia, University Press, New York. p.27-40. 1982.

Blouin, M. S. Comparing Bivariate Reaction Norms among Species - Time and Size at Metamorphosis in 3 Species of Hyla (Anura, Hylidae). Oecologia, v.90, n.2, May, p.288-293. 1992.

Brattstrom, B. H. Thermal Acclimation in Anuran Amphibians as a Function of Latitude and Altitude. Comparative Biochemistry and Physiology, v.24, n.1, p.93-&. 1968.

_____. Call Order and Social Behavior in the Foam-Building Frog, *Engystomops Pustulosus*. American Zoologist, v.2, n.3, p.394-394. 1962.

Buchholz, D. R. e T. B. Hayes. Evolutionary patterns of diversity in spadefoot toad metamorphosis (Anura : Pelobatidae). Copeia, n.1, Feb 8, p.180-189. 2002.

Carnaval, A. C. O. Q. Frogs in forest fragments of northeastern Brazil: a phylogeographic study. American Zoologist, v.41, n.6, Dec, p.1406-1407. 2001.

Chaparro, J. G., J. B. Pramuk, *et al.* Secondary homonymy of *Bufo proboscideus* Spix, 1824, with *Phryniscus proboscideus* Boulenger, 1882. Copeia, n.4, Dec 28, p.1029-1029. 2007.

Deutsch, C. A., J. J. Tewksbury, *et al.* Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.105, n.18, May 6, p.6668-6672. 2008.

Dewitt, T. J., A. Sih, *et al.* Costs and limits of phenotypic plasticity. Trends in Ecology & Evolution, v.13, n.2, Feb, p.77-81. 1998.

Donohue, K., E. H. Pyle, *et al.* Adaptive divergence in plasticity in natural populations of *Impatiens capensis* and its consequences for performance in novel habitats. Evolution, v.55, n.4, Apr, p.692-702. 2001.

Duellman, W. E. Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1999.

Etterson, J. R. Evolutionary potential of *Chamaecrista fasciculata* in relation to climate change. 1. Clinal patterns of selection along an environmental gradient in the great plains. Evolution, v.58, n.7, Jul, p.1446-1458. 2004.

Falconer, D. S. e T. F. C. Mackay. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Essex: Longman Group Ltda., 1998. 450p.

Feder, M. E. e G. E. Hofmann. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, v.61, p.243-282. 1999.

Floyd, R. B. Ontogenetic Change in the Temperature Tolerance of Larval Bufo-Marinus (Anura, Bufonidae). Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology, v.75, n.2, p.267-271. 1983.

Frost, D. R., T. Grant, *et al.* The amphibian tree of life. Bulletin of the American Museum of Natural History, n.297, p.8-370. 2006.

Ghalambor, C. K., J. K. McKay, *et al.* Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. Functional Ecology, v.21, n.3, Jun, p.394-407. 2007.

Gomez-Mestre, I. e D. R. Buchholz. Developmental plasticity mirrors differences among taxa in spadefoot toads linking plasticity and diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.103, n.50, Dec 12, p.19021-19026. 2006.

Gosner, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, v.16, p.183-190. 1960.

Hartwig, W. C. e C. Cartelle. A complete skeleton of the giant South American primate Protopithecus. Nature, v.381, n.6580, May 23, p.307-311. 1996.

Hensley, F. R. Ontogenic Loss of Phenotypic Plasticity of Age at Metamorphosis in Tadpoles. Ecology, v.74, n.8, Dec, p.2405-2412. 1993.

Hentschel, B. T. Complex life cycles in a variable environment: Predicting when the timing of metamorphosis shifts from resource dependent to developmentally fixed. American Naturalist, v.154, n.5, Nov, p.549-558. 1999.

Heyer, W. R., A. S. Rand, *et al.* Frogs of Boracéia. Special Publication Of the Arquivos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 1990.

Hochachka, P. W. e Somero, G. N. Biochemical Adaptation. Princeton, N.J. Princeton University Press. 2002.

Huey, R. B. e J. G. Kingsolver. Evolution of Thermal Sensitivity of Ectotherm Performance. Trends in Ecology & Evolution, v.4, n.5, May, p.131-135. 1989.

Huey, R. B. e R. D. Stevenson. Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms - Discussion of Approaches. American Zoologist, v.19, n.1, p.357-366. 1979.

Jared, C., M. M. Antoniazzi, *et al.* Some aspects of the natural history of the casque-headed tree frog Corythomantis greeningi Boulenger (Hylidae). Annales Des Sciences Naturelles-Zoologie Et Biologie Animale, v.20, n.3, Jul-Sep, p.105-115. 1999.

_____. Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog Corythomantis greeningi. Journal of Zoology, v.265, Jan, p.1-8. 2005.

Lee, C. E., J. L. Remfert, *et al.* Evolution of physiological tolerance and performance during freshwater invasions. Integrative and Comparative Biology, v.43, n.3, Jun, p.439-449. 2003.

Leroi, A. M., A. F. Bennett, *et al.* Temperature-Acclimation and Competitive Fitness - an Experimental Test of the Beneficial Acclimation Assumption. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.91, n.5, Mar 1, p.1917-1921. 1994.

Levins, R. Theory of Fitness in a Heterogeneous Environment .1. Fitness Set and Adaptive Function. American Naturalist, v.96, n.891, p.361-&. 1962.

_____. Theory of Fitness in a Heterogeneous Environment .1. Developmental Flexibility and Niche Selection. American Naturalist, v.97, n.893, p.75-&. 1963.

Lewontin, R. C. The Adaptations of Populations to Varying Environments. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v.22, p.395-408. 1957.

_____. Analysis of Variance and Analysis of Causes. American Journal of Human Genetics, v.26, n.3, p.400-411. 1974.

Lind, M. I. e F. Johansson. The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. Journal of Evolutionary Biology, v.20, n.4, Jul, p.1288-1297. 2007.

_____. Costs and Limits of Phenotypic Plasticity in Island Populations of the Common Frog *Rana Temporaria* under Divergent Selection Pressures. Evolution, v.63, n.6, Jun, p.1508-1518. 2009.

Loeschcke, V., R. A. Krebs, *et al.* Genetic-Variation for Resistance and Acclimation to High-Temperature Stress in *Drosophila-Buzzatii*. Biological Journal of the Linnean Society, v.52, n.1, May, p.83-92. 1994.

Lowe, C. H. e V. J. Vance. Acclimation of the Critical Thermal Maximum of the Reptile *Urosaurus Ornatus*. Science, v.122, n.3158, p.73-74. 1955.

Lynch, J. D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publications, v.53, p.1-238.

Morand, A., P. Joly, *et al.* Phenotypic variation in metamorphosis in five anuran species along a gradient of stream influence. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences, v.320, n.8, Aug, p.645-652. 1997.

Morey, S. e D. Reznick. A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. Ecology, v.81, n.6, Jun, p.1736-1749. 2000.

_____. Effects of larval density on postmetamorphic spadefoot toads (*Spea hammondi*). Ecology, v.82, n.2, Feb, p.510-522. 2001.

Morey, S. R. e D. N. Reznick. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. Oikos, v.104, n.1, Jan, p.172-190. 2004.

Narvaes, P. e Rodrigues, M. T. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. Arquivos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, v.40, n.1, p.1-73. 2009.

Navas, C. A. Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation neotropical anurans. Oecologia, v.108, n.4, Dec, p.617-626. 1996.

_____. Herpetological diversity along Andean elevational gradients: links with physiological ecology and evolutionary physiology. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology, v.133, n.3, Nov, p.469-485. 2002.

Navas, C. A., M. M. Antoniazzi, *et al.* Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulatus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, v.147, n.3, Jul, p.647-657. 2007.

Newman, R. A. Genetic-Variation for Larval Anuran (*Scaphiopus-Couchii*) Development Time in an Uncertain Environment. Evolution, v.42, n.4, Jul, p.763-773. 1988.

_____. Developmental Plasticity of *Scaphiopus-Couchii* Tadpoles in an Unpredictable Environment. Ecology, v.70, n.6, Dec, p.1775-1787. 1989.

_____. Adaptive Plasticity in Amphibian Metamorphosis. Bioscience, v.42, n.9, Oct, p.671-678. 1992.

_____. Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. Oecologia, v.115, n.1-2, Jun, p.9-16. 1998.

Niehaus, A. C., R. S. Wilson, *et al.* Short- and long-term consequences of thermal variation in the larval environment of anurans. Journal of Animal Ecology, v.75, n.3, May, p.686-692. 2006.

Nimer, E. Climatologia da Região Nordeste do Brasil: Introdução à Climatologia Dinâmica. Revista Brasileira de Geografia, v.34, p.3-51. 1972.

Olsson, M. e T. Uller. Developmental stability and genetic architecture: a comparison within and across thermal regimes in tadpoles. Journal of Evolutionary Biology, v.15, n.4, Jul, p.625-633. 2002.

Pigliucci, M. How organisms respond to environmental changes: From phenotypes to molecules (and vice versa). Trends in Ecology & Evolution, v.11, n.4, Apr, p.168-173. 1996.

_____. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2001. 631p.

Pramuk, J. B. Phylogeny of South American Bufo (Anura : Bufonidae) inferred from combined evidence. Zoological Journal of the Linnean Society, v.146, n.3, Mar, p.407-452. 2006.

Pramuk, J. B., T. Robertson, *et al.* Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura : Bufonidae). Global Ecology and Biogeography, v.17, n.1, Jan, p.72-83. 2008.

Reis, A. C. de Souza. Clima da Caatinga. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.48, p.325-335. 1976.

Relyea, R. A. Costs of phenotypic plasticity. American Naturalist, v.159, n.3, Mar, p.272-282. 2002.

Richards, C. L., O. Bossdorf, *et al.* Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. Ecology Letters, v.9, n.8, Aug, p.981-993. 2006.

Roberts, S. P. e M. E. Feder. Changing fitness consequences of hsp70 copy number in transgenic Drosophila larvae undergoing natural thermal stress. Functional Ecology, v.14, n.3, Jun, p.353-357. 2000.

Rudolf, V. H. W. e M. O. Rodel. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. Evolutionary Ecology, v.21, n.1, Jan, p.121-142. 2007.

Schlichting, C. D. Hidden Reaction Norms, Cryptic Genetic Variation, and Evolvability. Year in Evolutionary Biology 2008, v.1133, p.187-203. 2008.

Schlichting, C. D. e M. Pigliucci. Control of Phenotypic Plasticity Via Regulatory Genes. American Naturalist, v.142, n.2, Aug, p.366-370. 1993.

_____. Gene-Regulation, Quantitative Genetics and the Evolution of Reaction Norms. Evolutionary Ecology, v.9, n.2, Mar, p.154-168. 1995.

_____. Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 1998. 344p.

Semlitsch, R. D. Pedomorphosis in Ambystoma-Talpoideum - Effects of Density, Food, and Pond Drying. Ecology, v.68, n.4, Aug, p.994-1002. 1987.

- Sherman, E. Ontogenetic Change in Thermal Tolerance of the Toad *Bufo-Woodhousii* Fowleri. Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology, v.65, n.2, p.227-230. 1980.
- Smith-Gill, S. J. Developmental Plasticity - Developmental Conversion Versus Phenotypic Modulation. American Zoologist, v.23, n.1, p.47-55. 1983.
- Smith-Gill, S. J. e K. A. Berven. Predicting Amphibian Metamorphosis. American Naturalist, v.113, n.4, p.563-585. 1979.
- Sorensen, J. G., M. Pekkonen, *et al.* Complex patterns of geographic variation in heat tolerance and Hsp70 expression levels in the common frog *Rana temporaria*. Journal of Thermal Biology, v.34, n.1, Jan, p.49-54. 2009.
- Steiner, U. K. e J. Van Buskirk. Environmental stress and the costs of whole-organism phenotypic plasticity in tadpoles. Journal of Evolutionary Biology, v.21, n.1, Jan, p.97-103. 2008.
- Sultan, S. E. e F. A. Bazzaz. Phenotypic Plasticity in *Polygonum-Persicaria* .3. The Evolution of Ecological Breadth for Nutrient Environment. Evolution, v.47, n.4, Aug, p.1050-1071. 1993.
- Tilman, D., R. M. May, *et al.* Habitat Destruction and the Extinction Debt. Nature, v.371, n.6492, Sep 1, p.65-66. 1994.
- Trefaut-Rodrigues, M. Herpetofauna da Caatinga. *In*: Leal, I. R., M. Tabarelli *et al.* Ecologia e Conservação da Caatinga, Ed. Universitária, UFPE. 2003.
- Van Buskirk, J. A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: Relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. American Naturalist, v.160, n.1, Jul, p.87-102. 2002.
- Van Buskirk, J., S. A. Mccollum, *et al.* Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles. Evolution, v.51, n.6, Dec, p.1983-1992. 1997.
- Van Buskirk, J. e U. K. Steiner. The fitness costs of developmental canalization and plasticity. Journal of Evolutionary Biology, v.22, n.4, Apr, p.852-860. 2009.
- Via, S. Adaptive Phenotypic Plasticity - Target or by-Product of Selection in a Variable Environment. American Naturalist, v.142, n.2, Aug, p.352-365. 1993.
- Via, S., R. Gomulkiewicz, *et al.* Adaptive Phenotypic Plasticity - Consensus and Controversy. Trends in Ecology & Evolution, v.10, n.5, May, p.212-217. 1995.
- Vonesh, J. R. Sequential predator effects across three life stages of the African tree frog, *Hyperolius spinigularis*. Oecologia, v.143, n.2, Mar, p.280-290. 2005.
- Waddington, C. H. Analization of development and the inheritance of acquired characters. Nature, v.150, Jul-Dec, p.563-565. 1942.

_____. Experiments on Canalizing Selection. Genetical Research, v.1, n.1, p.140-150. 1960.

Werner, E. E. Amphibian Metamorphosis - Growth-Rate, Predation Risk, and the Optimal Size at Transformation. American Naturalist, v.128, n.3, Sep, p.319-341. 1986.

Westerberhard, M. J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. Annual Review of Ecology and Systematics, v.20, p.249-278. 1989.

Wilbur, H. M. e J. P. Collins. Ecological Aspects of Amphibian Metamorphosis. Science, v.182, n.4119, p.1305-1314. 1973.

Yeh, P. J. e T. D. Price. Adaptive phenotypic plasticity and the successful colonization of a novel environment. American Naturalist, v.164, n.4, Oct, p.531-542. 2004.

Tabela 2. ANOVA hierárquica paraa variável massa no experimento de campo com *Rhinella icterica*. O fator gaiola, com quatro níveis, foi aninhado no fator ambiente, com dois níveis. Ambos os fatores foram significativos, e o fator ambiente explicou 99% da variação dos dados.

Testes entre sujeitos

Fonte	Soma de quadrados III	gl	Quadrado médio	F	Sig.	Eta ao quadrado parcial
Ambiente	1,269	2	,634	12,528	,009	,991
Hipótese Erro	,011	2	,006 ^a			
Gaiola(Ambiente)	,011	2	,006	6,771	,002	,213
Hipótese Erro	,042	50	,001 ^b			

a. MS(Gaiola(Ambiente))

b. MS(Erro)

Testes entre sujeitos

a					
Fonte	Soma de quadrados III	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo	1,277 ^a	4	,319	383,507	,000
Gaiola	1,277	4	,319	383,507	,000
Erro	,042	50	,001		
Total	1,319	54			

a. R ao quadrado = ,968 (R ao quadrado ajustado = ,966)

Tabela 3. ANOVA univariada e teste de comparações múltiplas de Tukey da massa média do experimento de campo com *Rhinella icterica*. O fator gaiola, com quatro níveis, foi considerado como principal na análise e comparações entre todas as gaiolas, par a par, foram feitas pelo teste de Tukey HSD. Somente as gaiolas 3 e 4, presentes na pedreira, não foram diferentes. 1: Cachoeira 1; 2: Cachoeira 2; 3: Pedreira 1; 4: Pedreira 2.

Comparações Múltiplas

Tukey HSD		Diferença média	Erro padrão	Sig.	95% Intervalo de Confiança	
(I) Gaiola.ictérica	(J) Gaiola.ictérica				Faixa menor	Faixa maior
1	2	,0433*	,01178	,003	,0120	,0746
	3	,1147*	,01178	,000	,0834	,1460
	4	,1136*	,01195	,000	,0818	,1453
2	1	-,0433*	,01178	,003	-,0746	-,0120
	3	,0713*	,01054	,000	,0433	,0993
	4	,0702*	,01072	,000	,0417	,0987
3	1	-,1147*	,01178	,000	-,1460	-,0834
	2	-,0713*	,01054	,000	-,0993	-,0433
	4	-,0011	,01072	1,000	-,0296	,0274
4	1	-,1136*	,01195	,000	-,1453	-,0818
	2	-,0702*	,01072	,000	-,0987	-,0417
	3	,0011	,01072	1,000	-,0274	,0296

Baseado nas médias observadas

*. A diferença média é significante a 0,05.

Tabela 4. Comparações das curvas de sobrevivência do experimento de campo com *Rhinella granulosa*. As curvas de sobrevivência não foram iguais para as larvas de R. granulosa submetidas aos regimes térmicos semi-naturais em campo, mostrando que existiu variação entre famílias na sobrevivência.

Comparações Gerais

	Quiquadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-)	34,527	4	,000

Teste de igualdade das distribuições de sobrevivênc diferentes níveis de R. granulosa

Comparações par a par

Log Rank	Gaiola granulosa	1		5		8		11		12	
		quadr.	Sig.	quadr.	Sig.	quadr.	Sig.	quadr.	Sig.	quadr.	Sig.
1	5	9,794	,002	9,794	,002	5,648	,017	2,428	,119	1,262	,261
	8	5,648	,017	0,931	,000	0,931	,000	,748	,387	6,295	,000
	11	2,428	,119	,748	,387	3,882	,000	3,882	,000	2,242	,134
	12	1,262	,261	6,295	,000	2,242	,134	5,340	,021	5,340	,021

Tabela 5. Comparações das curvas de sobrevivência do experimento de desenvolvimento com *Rhinella ornata*. Verificada a diferença entre as curvas na comparação geral, comparações par a par foram feitas entre todos os tratamentos: 1) moda de 20°C ; 2) moda de 20°C e variação de 18 a 22°C; 3) moda de 20°C e variação de 18 a 26°C; 4) moda de 27°C; 5) moda de 27°C e variação de 25 a 29°C e 6) moda de 27°C e variação de 25 a 34°C.

Comparações Gerais

	Quiquadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	21,891	5	,001

Teste de igualdade das funções de sobrevivência para os diferentes níveis de R. ornata.lab

Comparações par a par

Tratamento	1	2	3	4	5	6
	quadrado	quadrado	quadrado	quadrado	quadrado	quadrado
	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
Log 1						
Rar 2	,004	,004	1,220	5,165	,535	7,794
Co 3	1,220	1,252	1,252	5,774	,710	8,729
Co 4	5,165	5,774	0,474	0,474	3,451	5,048
5	,535	,710	3,451	2,838	0,092	,128
6	7,794	8,729	5,048	,128	4,354	0,037

Tabela 6. Correlações das variáveis de desenvolvimento de *Rhinella ornata*. Foram feitas correlações de Pearson para as variáveis taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento e massa na metamorfose, para cada uma das modas de temperatura. As correlações à direita são para a moda de 20°C, e à esquerda, para a moda de 27°C. Todas as correlações foram significativas.

Correlações				Correlações			
Tx.cresc.20				Tx.cresc.27			
Tx.cresc.20	Correlação de Pearson	1	Tempo.20	Correlação de Pearson	1	Tempo.27	Massa.27
	Sig. (bicaudal)			Sig. (bicaudal)			
	N	41	35	N	59	54	54
Tempo.20	Correlação de Pearson	-,554**	1	Correlação de Pearson	-,681**	1	-,523**
	Sig. (bicaudal)	,001		Sig. (bicaudal)	,000		,000
	N	35	35	N	54	54	54
Massa.20	Correlação de Pearson	,462**	,395*	Correlação de Pearson	,854**	-,523**	1
	Sig. (bicaudal)	,005	,019	Sig. (bicaudal)	,000	,000	
	N	35	35	N	54	54	54

** . Correlação é significativa no nível 0,01 (bicaudal)

* . Correlação é significativa no nível 0,05 (bicaudal)

** . Correlação é significativa no nível 0,01 (bicaudal).

Tabela 7. ANOVA de duas vias e testes pos-hoc de Tuckey para a massa na metamorfose das larvas de *Rhinella ornata* submetidas ao experimento de desenvolvimento. Os fatores moda e variação da temperatura foram analisados como fixos. No teste de Tuckey, somente diferiram os tratamentos de variação 4°C e 8°C.

Testes de Efeitos entre Sujeitos

41

Fonte	Soma de Quadrados Tipo III	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Modelo	6,170 ^a	6	1,028	461,124	,000
Moda	,079	1	,079	35,393	,000
Variação	,070	2	,035	15,789	,000
Moda * Variação	,020	2	,010	4,546	,013
Erro	,216	97	,002		
Total	6,386	103			

a. R ao quadrado = ,966 (R ao quadrado ajustado = ,964)

Comparações Múltiplas

Tukey HSD

(I) Variação	(J) Variação	Diferença Média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de Confiança	
					Limite inferior	Limite superior
0	4	,0257	,01168	,076	-,0021	,0536
	8	,0620*	,01181	,000	,0338	,0901
4	0	-,0257	,01168	,076	-,0536	,0021
	8	,0362*	,01261	,014	,0061	,0663
8	0	-,0620*	,01181	,000	-,0901	-,0338
	4	-,0362*	,01261	,014	-,0663	-,0061

Baseado nas médias observadas.

*. A diferença média é significativa a 0.05

Tabela 8. ANOVA de duas vias para os dados de taxa de crescimento do experimento de desenvolvimento com *R. icterica*. Os fatores moda e variação foram analisados como fixos. A moda isolada e a interação entre moda e variação da temperatura foram significativas.

Teste de Efeito entre Sujeitos

Fonte	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo	6814,033 ^a	6	1135,672	41,076	,000
Moda	593,508	1	593,508	21,466	,000
Variação	31,705	2	15,852	,573	,573
Moda * Variação	252,049	2	126,024	4,558	,023
Erro	552,967	20	27,648		
Total	7367,000	26			

a. R ao quadrado = ,925 (R ao quadrado ajustado = ,902)

Tabela 9. ANOVA de duas vias para os dados de massa na metamorfose do experimento de desenvolvimento com *R. icterica*. Os fatores moda e variação foram analisados como fixos. Apesar do modelo ter sido significativo, nenhum dos fatores ou a interação entre eles o foram.

Testes de Efeitos entre Sujeitos

41.ict

Fonte	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Modelo	1,569 ^a	6	,262	144,841	,000
Moda.ict	,003	1	,003	1,550	,230
Variação.ict	,007	2	,004	2,029	,162
Moda.ict * Variação.	,009	2	,005	2,590	,104
Erro	,031	17	,002		
Total	1,600	23			

a. R ao quadrado = ,981 (R ao quadrado ajustado = ,974)

Tabela 10. ANOVA de duas vias para os dados de Temperatura Crítica Máxima (TCMax). Os fatores temperatura de aclimação e espécie foram analisados como fixos. Ambos foram significativos, assim como a interação entre eles. O teste de Tukey indicou que as três espécies são distintas quanto aos seus respectivos TCMax. 1: *R. ornata*, 2: *R. granulosa* e 3: *R. icterica*.

Testes de Efeitos entre Sujeitos

Fonte	Soma de Quadrados tipo III	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Modelo	188851,214 ^a	6	31475,202	49175,561	,000
Aclimação	74,253	1	74,253	116,010	,000
Espécie	105,653	2	52,826	82,534	,000
Aclimação * Espécie	14,220	2	7,110	11,109	,000
Erro	65,286	102	,640		
Total	188916,500	108			

a. R ao quadrado = 1,000 (R ao quadrado ajustado = 1,000)

Comparações Múltiplas

Tukey HSD

(I) Espécie	(J) Espécie	Diferença Média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de Confiança	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	-2,82 [*]	,203	,000	-3,31	-2,34
	3	-,82 [*]	,185	,000	-1,26	-,38
2	1	2,82 [*]	,203	,000	2,34	3,31
	3	2,01 [*]	,233	,000	1,45	2,56
3	1	,82 [*]	,185	,000	,38	1,26
	2	-2,01 [*]	,233	,000	-2,56	-1,45

Baseado nas médias observadas

^{*}. A diferença média é significante a 0,05.