

Monique Nouailhetas Simon

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

São Paulo

2010

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.

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} = “coeficient 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.

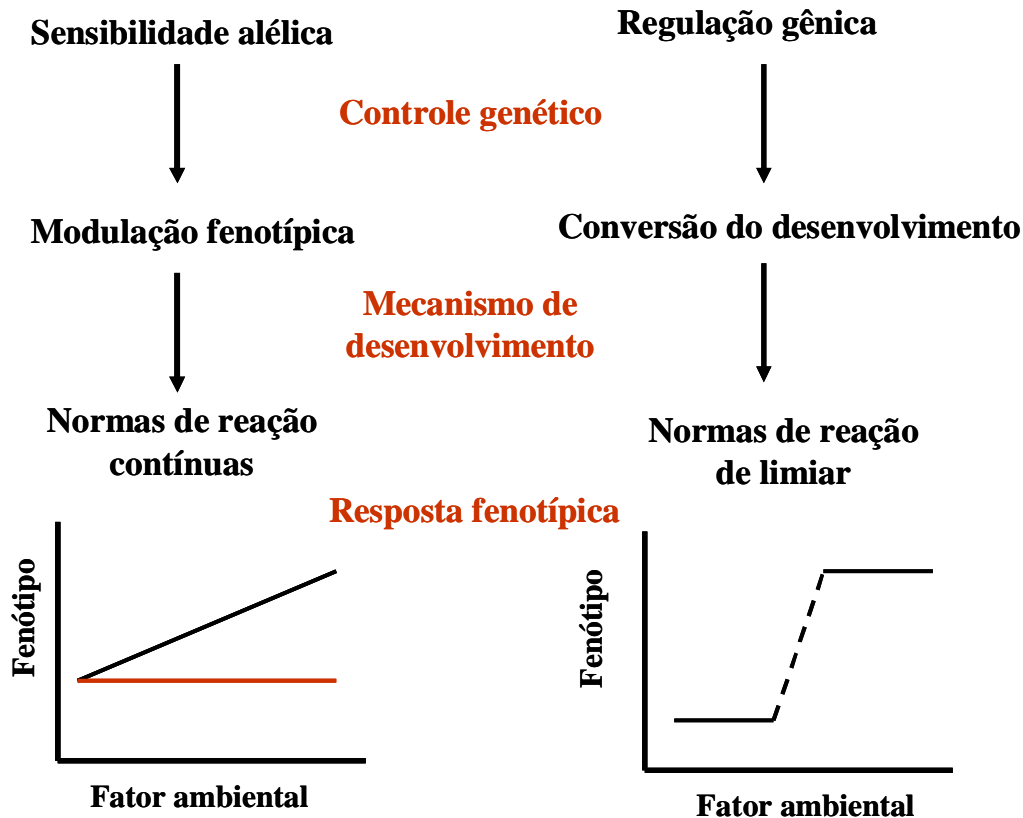


Figura 1. Tipos de respostas plásticas e normas de reação correspondentes. As duas respostas plásticas diferem em seu controle genético e em seu mecanismo de desenvolvimento. Na modulação fenotípica, os mesmos genes são expressos em todos os ambientes, mas com diferentes efeitos, gerando respostas contínuas, 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, Bosssdorf *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, Bosssdorf *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 frequência de ocorrência naquele ambiente (Figura 2).

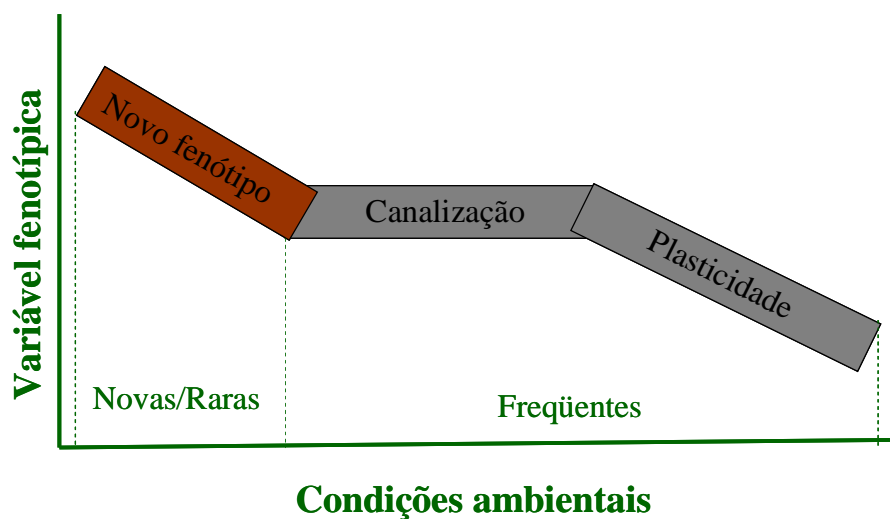


Figura 2. Padrões possíveis de uma norma de reação. Estão representados três padrões de resposta fenotípica em porções de uma norma de reação: norma oculta (em vermelho), norma canalizada e norma plástica. Uma parte oculta de uma norma significa uma expressão fenotípica que somente se revela em condições 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 Schlitching 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 (observações pessoais). 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 específicas 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 conseguinte 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 Nicieza, 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.

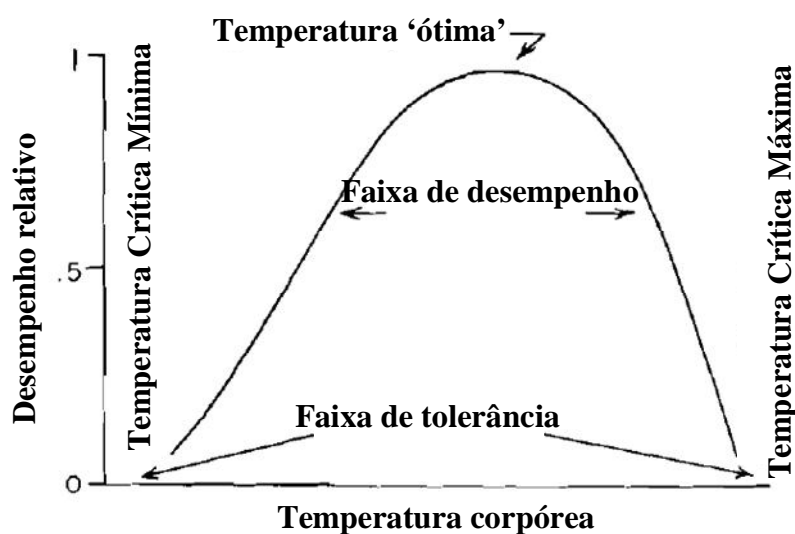


Figura 3. Curva de desempenho e faixa de tolerância térmica. O esquema mostra onde se inserem os parâmetros temperatura crítica máxima e mínima na curva de desempenho. Os limites térmicos determinam a faixa de tolerância, fora da qual o desempenho dos indivíduos é seriamente comprometido. Também está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

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.

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.

Baldissera 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. Paleoenvironmental 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.