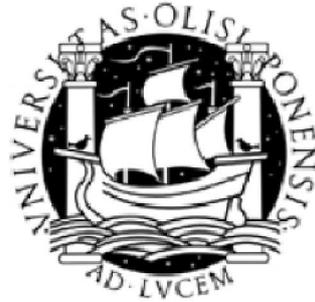


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



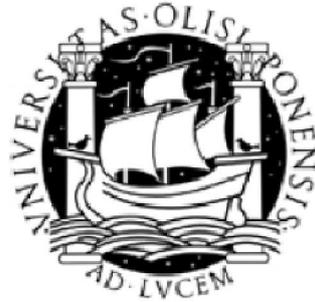
**Estudo da influência de parâmetros ambientais
no desenvolvimento larvar de *Pelophylax perezi*
(uma abordagem das histórias de vida)**

Célia Maria Kun Rodrigues

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Estudo da influência de parâmetros ambientais
no desenvolvimento larvar de *Pelophylax perezi*
(uma abordagem das histórias de vida)**

Célia Maria Kun Rodrigues

**Dissertação orientada por:
Professor Doutor Luís António de Matos Vicente**

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2010

À minha família

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Luís Vicente, por ter aceitado orientar a presente tese de mestrado e pela ajuda prestada, apesar do Ataque Violento do Capital.

Ao Professor Doutor Pedro Granadeiro e à Doutora Judite Alves, pela disponibilização do laboratório de ecologia do Museu Nacional de História Natural, para a realização deste trabalho.

Ao ICNB, pela autorização da manipulação dos girinos e da colheita das posturas de ovos no Parque Nacional da Peneda-Gerês.

Ao laboratório da Professora Doutora Margarida Matos, pelas moscas que cederam, para alimentar as rãs recém-metamorfoseadas, em detrimento de uma viagem à estância de esqui. Especialmente, à Inês, pelo encorajamento e apoio, e à Marta, pelas explicações de estatística, mau grado estar de baixa e não conseguir mexer o pescoço.

À Ana Hasse, companheira de campo, pela imensa ajuda prestada e pela paciência demonstrada nas viagens de carro e nos charcos, aquando das nossas conversas e cantorias. Ah, e pelo clube anti-*barbies*.

À Bárbara, companheira de campo e laboratório, pelo apoio, conversas, danças, música dos *Happy Tree Friends*, e por se assustar cada vez que chegava ao laboratório.

Ao Tomás Pais de Azevedo, pelas dicas que deu com os programas de análise de imagens e pelas discussões sobre a análise dos dados.

Ao menino da *pizzaria*.

Aos caramelos espanhóis e às maçãs de Leitão.

À existência de deus e do diabo... Não, desculpe. À existência de Darwin, Wallace e da Síntese Evolutiva Moderna, que me permitem responder, para aqueles que acham que o Homem é o ser vivo mais evoluído neste planeta, que, se a Evolução é, entre outras coisas, uma acumulação de erros, somos as maiores aberrações existentes.

A todos os colegas do mestrado que tornaram o primeiro ano bastante suportável, pelo bolo-surpresa com um embrião e pelo atum com batata.

À Aurora, pelas conversas sérias e menos sérias e pela solidariedade.

Às Baiucas (Carla, Cláudia, Filipa, Inês, Luísa, Milene, Sara), por não perceberem porque tinha de ir a Lisboa tratar de girinos num domingo, mas que alegraram muitas noites com o Singstar, o Buzz e as tabelas da Luísa.

Ao Grupo de Estudo, Isabel e Rita, pela partilha das desgraças... não... partilha do conhecimento, e pela companhia até altas horas da noite entre cafés, conversas no *msm* na mesma sala, séries e música dos Green Day e dos The Verve...

E, claro, à minha gata, por ser muito “fofinha”, quando fica o dia todo a dormir a fazer inveja.

Resumo

Os anfíbios apresentam variações geográficas em vários aspectos das histórias de vida. Investigaram-se as causas das variações num gradiente de altitudes, no estágio larvar de *Pelophylax perezí*, de modo a perceber se eram provocadas por adaptação local ou plasticidade fenotípica. Utilizaram-se características das histórias de vida, de forma a tentar destrinçar a componente genética da ambiental. Os tamanhos e a diferenciação dos girinos foram medidos, mensalmente, em charcos naturais e em experiências de *common garden* no laboratório, em que se usaram dois níveis de temperatura. Na maioria dos casos, observou-se uma resposta semelhante das características consoante a origem e a temperatura, tendo-se apenas prolongado o período larvar na temperatura mais elevada. Não parecem existir diferenças genéticas entre as populações, mas observou-se um efeito ambiental, em que diferentes temperaturas da água influenciam o desenvolvimento dos girinos.

Palavras-chave: Variação geográfica, temperatura, histórias de vida, desenvolvimento larvar, *Pelophylax perezí*.

Abstract

Amphibians have geographic variations in many aspects of life history. The causes of variation in an altitudinal gradient in the larval stage of *Pelophylax perezii* have been investigated in order to see whether they were caused by local adaptation or phenotypic plasticity. We used life history traits in order to try to disentangle the genetic component from the environment component. Size and differentiation of tadpoles were measured monthly in natural ponds and in common garden experiments in the laboratory, where were used two levels of temperature. In most cases, traits responded similarly according to the origin and temperature and only the larval period at higher temperature was prolonged. There seem to be no genetic differences between populations, but an environmental effect, where different water temperatures influence the development of tadpoles.

Keywords: Geographic variation, temperature, life history, larval development, *Pelophylax perezii*

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Quadros	viii
Introdução.....	1
Estudos em anfíbios	3
<i>Pelophylax perezii</i>	6
Objectivos.....	7
Material e Métodos	8
Populações experimentais	8
Procedimentos de campo.....	8
Recolha do material biológico e manutenção no laboratório	9
Testes no laboratório	10
Recolha e análise dos dados	11
Resultados	13
Estatística descritiva.....	13
Análises dos dados de laboratório.....	14
Regressões lineares	21
Análises dos dados de campo	22
Discussão.....	28
Comparação das histórias de vida no laboratório	28
Comparação das histórias de vida em ambiente natural	30
Considerações	32
Perspectivas futuras.....	34
Bibliografia.....	36
Anexos.....	42

Lista de Figuras

Figura 1. Ponto de vista da evolução por um ecologista evolutivo.....	2
Figura 2. Mapa com a localização dos charcos e respectiva altitude.....	8
Figura 3. Esquema exemplificativo da experiência conduzida no laboratório.....	11
Figura 4. Parâmetros morfológicos medidos ao longo da fase larvar.....	12
Figura 5. Gráficos da evolução dos estádios ao longo das semanas nas experiências no laboratório.....	18
Figura 6. Gráficos das durações do período larvar e até ao início da metamorfose.....	19
Figura 7. Curvas de crescimento ao longo do desenvolvimento (estádios) para as sete medidas estudadas dos girinos criados nos dois regimes de temperatura.....	20-21
Figura 8. Curvas de crescimento das variáveis ao longo dos meses de trabalho de amostragem nos vários charcos.....	23
Figura 9. Curvas de crescimento ao longo dos estádios para os indivíduos estudados no campo.....	25
Figura 10. Evolução dos estádios no campo, ao longo dos meses, para cada charco...	24

Lista de Quadros

- Quadro 1.** Valores de p resultantes da MANOVA com a qual se testou o efeito da temperatura da água (Temperatura) e do local de origem dos girinos (Charco) nas medidas corporais em cada semana.....14
- Quadro 2.** Valores de p obtidos pela ANOVA e pelo teste Kruskal-Wallis com os quais se testou o efeito da temperatura da água no desenvolvimento dos girinos com todos os charcos confundidos.....15
- Quadro 3.** Valores de p obtidos pela ANOVA e pelo teste Kruskal-Wallis com os quais se testou o efeito da origem dos girinos no seu desenvolvimento em cada temperatura.....16
- Quadro 4.** Valores de p obtidos pela ANOVA e pelo teste Kruskal-Wallis com os quais se testou o efeito da temperatura da água na diferenciação dos girinos com todos os charcos confundidos.....17
- Quadro 5.** Estatística descritiva da regressão linear entre os estádios e as seis semanas de trabalho experimental no laboratório.....22
- Quadro 6.** Valores de p obtidos pelo teste Kruskal-Wallis com o qual se testou o efeito da origem (charco) dos girinos no seu crescimento (dados de campo).....24
- Quadro 7.** Valores de p obtidos pelo teste Kruskal-Wallis com o qual se compararam os estádios presentes nos charcos em cada mês como a variação dos estádios em cada charco ao longo dos meses.....24
- Quadro 8.** Valores de p obtidos através do teste Mann-Whitney U com o qual se compararam os dados, dos estádios e das sete medidas estudadas, de um mês de cada charco com os dados do mês seguinte.....27
- Quadro 9.** Temperaturas da água (°C) durante o dia, consoante os charcos e os meses, e descrição do efeito do coberto vegetal na extensão de água.....32

Introdução

Um dos maiores desafios da Biologia Evolutiva consiste em estabelecer relações de causa e efeito entre factores ambientais e características dos organismos, de modo a tentar perceber alguns mecanismos de adaptação por selecção natural e a história evolutiva dos organismos (Reznick, 1996). Uma maneira de compreender os processos adaptativos e evolutivos passa por estudos de genética populacional. Outro modo de os perceber passa pela análise da história de vida, que é definida como o resultado da influência diferencial do conjunto de variáveis (morfológicas, comportamentais e demográficas) que contribuem para o modo como os organismos se propagam (Reznick, 1996). Ou seja, as características da história de vida estão directamente envolvidas na sobrevivência e na reprodução e são elas o tamanho no nascimento, a idade e o tamanho na maturidade, as taxas da mortalidade, entre outros (Cole *in* Stearns, 1986). A teoria da história de vida supõe que exista uma medida da *fitness* (aptidão de um indivíduo para propagar os seus genes) definível que é maximizada pela selecção natural e que existem compromissos que limitam o número de possíveis combinações entre características (Roff, 2007).

Na teoria da história de vida, tem-se uma superfície visível que é composta pelos organismos individuais, a sua demografia e características fisiológicas e o conjunto das condições ambientais nos quais estão inseridos. Associada, por inferências estatísticas, a esta estrutura superficial, encontra-se uma estrutura intermédia consistindo em parâmetros demográficos como estimativas para a idade na maturidade sexual, sobrevivência e fertilidade específica de cada idade, taxas de crescimento, tamanho dos descendentes, disponibilidade de recursos, clima, entre outros. Depende de uma última estrutura relacionada com parâmetros de medida da *fitness* como o modelo r/K ou a probabilidade de deixar descendentes, e está ligada por modelos como a equação de Euler-Lotka, de Lokta-Volterra e análogas (Stearns, 1977) (**Figura 1**).

A evolução morfológica foi estudada nos animais endotérmicos, tendo Bergmann proposto uma regra que afirmava existir um padrão interespecífico em que os indivíduos das regiões mais frias ou latitudes mais elevadas tinham tamanhos maiores. Esta regra foi refutada por não se aplicar a todos os animais endotérmicos e porque os tamanhos pareciam variar segundo factores bióticos, como o tipo de presa disponível (McNab, 1971). Além disso, os animais ectotérmicos, em que a temperatura ambiente

determina a taxa de desenvolvimento (Jarošík, 2004), pareciam seguir esses princípios, considerando a existência de clines no tamanho do corpo que aumenta com a altitude e a latitude, existindo, no entanto, várias exceções (Atkinson, 1995).

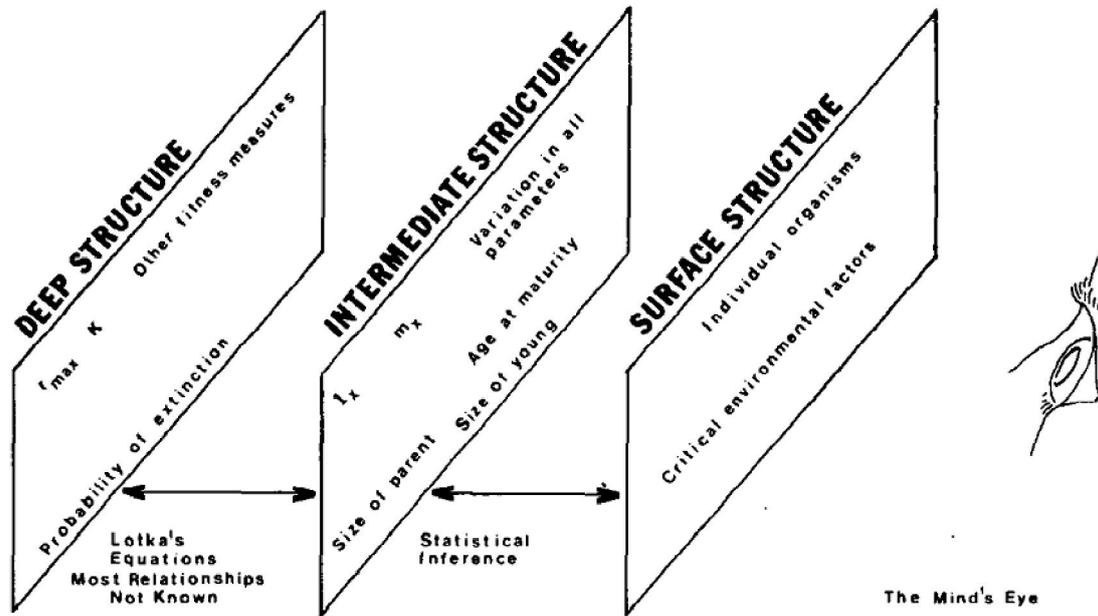


Figura 1. Ponto de vista da evolução por um ecologista evolutivo (Stearns, 1977).

Atkinson (1995) relembra que este padrão de resposta (ou norma de reacção) é igualmente consistente nos protistas e nas plantas, o que pode levar a pensar que são regulados por mecanismos semelhantes. Foram avançadas várias explicações para esta variação geográfica, como o facto de a temperatura poder estar a afectar as taxas metabólicas, em que a temperatura elevada aumenta o catabolismo, levando à diminuição da taxa de crescimento (Atkinson, 1994), ou existir uma mortalidade dependente do tamanho durante o Inverno, que explicaria a existência de animais ectotérmicos maiores em locais com temperaturas baixas (Martof, 1956; Conover, 2009).

Outra explicação prendia-se com a existência de uma relação entre o tamanho das células e do organismo, em que a temperatura de manutenção afectava o tamanho da célula, mantendo o número de células bastante conservado, produzindo indivíduos maiores (French, 1998). Anos antes, Alpatov (1930) observou que não era tudo explicado apenas pelo tamanho das células, sendo que o número também devia ter um papel significativo.

Esta plasticidade no desenvolvimento é guiada por dois mecanismos, por meio dos quais os factores ambientais podem alterar o fenótipo: *developmental conversion* (conversão do desenvolvimento) e *phenotypic modulation* (modulação do fenótipo) (Smith-Gill, 1983). O primeiro é mais comum e corresponde à utilização de pistas ambientais para activar diferentes cascatas moleculares que vão alterar a morfologia ou activar ou cessar certos processos da ontogenia. No segundo, o ambiente induz diferentes níveis de expressão de características fenotípicas em que o programa genético não é alterado.

Estudos em anfíbios

Os anfíbios são um grupo muito usado no estudo de diferenciação geográfica e da adaptação local por ocuparem uma grande variedade de *habitats*, mas terem poucas capacidades de dispersão (Reading, 1991; Hitchings, 1997), e porque os adultos são altamente filopátricos (Smith, 2005).

Existem vários estudos sobre variação de características da história de vida em função de parâmetros geográficos como a altitude ou a latitude em anfíbios, tanto em urodelos (e. g. Snyder, 1956; Bizer, 1978) como em anuros (e. g. Berven, 1982a, 1982b; Leclair, 1996; Laugen, 2003; Leskovar, 2006). Os factores ambientais analisados que poderão estar a induzir estratégias diferentes consoante os locais são a quantidade de recursos naturais (e. g. Travis, 1984; Newman, 1989), a densidade dos indivíduos (e. g. Adolph, 1931; Smith-Gill, 1979; Newman, 1989) e a dessecação dos habitats aquáticos em que as larvas se desenvolvem (e. g. Semlitsch, 1988; Crump, 1989; Laurila, 2002; Márquez-García, 2009), mas a temperatura é dada como um dos agentes mais importantes para a ocorrência de um desenvolvimento diferencial (Atkinson, 1994).

Em termos gerais, os indivíduos de populações de altitudes e latitudes elevadas têm períodos de actividade mais curtos, épocas de reprodução mais curtas, períodos larvares mais longos, são maiores em todos os estádios larvares, os adultos são maiores, atingem a maturidade sexual em idades mais avançadas, produzem menos posturas por ano, maiores em absoluto, mas menores relativamente ao tamanho do corpo, e produzem ovos maiores quando comparados com indivíduos de populações de baixas altitudes e latitudes (revisto em Morrison, 2003). Isto é válido tanto na comparação entre espécies como dentro da mesma espécie, salvo certas excepções (Morrison, 2003).

Estas exceções também ocorrem quando se tenta aplicar a regra de Bergmann a anfíbios em que os urodelos parecem segui-la, mas o mesmo não acontece em todos os anuros (Ashton, 2002).

O crescimento e tamanho foram também comparados entre fêmeas e machos da mesma latitude, sendo que as fêmeas cresciam mais depressa e eram maiores, em média, do que os machos (Leclair & Laurin, 1996). No mesmo estudo, sugeriu-se que a média de idade era mais elevada e a longevidade era maior apenas nas fêmeas da população mais a sul. Leclair e Laurin (1996) observaram que os indivíduos das populações mais a norte eram maiores do que os indivíduos das populações do sul, tanto na fase larvar como nos adultos, têm uma maior longevidade e uma maturidade mais atrasada.

Vários autores defendem que as variações observadas nos anfíbios serão devidas à plasticidade fisiológica e comportamental, em vez de se tratar de adaptação local (e. g. Bizer, 1978; Beebee, 1995). Existem várias maneiras de destringir o efeito da componente genética do da ambiental. Além de se recolherem dados dos vários locais, podem efectuar-se experiências de transplante, no campo, em que se efectuam translocações recíprocas de indivíduos entre charcos de baixas e elevadas altitudes. No caso de haver adaptação genética, não se vão observar diferenças entre os indivíduos translocados e a população de origem. Se as respostas dos indivíduos translocados forem semelhantes às dos indivíduos normalmente residentes nessas altitudes, o resultado corresponde apenas a uma aclimação. No caso de resultados em valores intermédios, sugere-se que os dois factores, a informação genética e o ambiente contribuem conjuntamente para estas características (Berven, 1982a). Além disto, experiências de *common garden* no laboratório ou, ainda, em que se varia um dos factores que se suspeita ser responsável pelas diferenças observadas, podem complementar os primeiros estudos (e. g. Berven, 1982b).

O estado larvar foi alvo de estudos nesta temática, porque várias das suas características estão associadas a uma maior sobrevivência e sucesso reprodutor no estado adulto (Martof, 1956; Licht, 1974; Smith-Gill, 1978; Berven, 1982a; Berven, 1990). Girinos e juvenis recém-metamorfoseados maiores têm vantagem face a predadores e tornam-se fêmeas maiores, cuja fecundidade é superior em termos de produção de maior número de ovos e girinos (Licht, 1974; Berven, 1983). Num estudo de 1987, Smith confirmou ainda que os indivíduos pós-metamórficos maiores e com metamorfose precoce reproduziam-se um ano mais cedo que os restantes e que obtiveram uma maior taxa de sobrevivência até atingirem a maturidade sexual. A partir

deste marco, não encontrou diferenças na sobrevivência. Berven (1983) e Semlitsch (1988) obtiveram resultados semelhantes. Semlitsch (1988) afirmou ainda que “a *fitness* de toda a vida de um indivíduo pode ser afectada pelo ambiente larvar”.

Muitas vezes, os indivíduos de charcos elevados são obrigados a passar um ou mais invernos no estado larvar (*overwintering*), nos casos em que não tiveram tempo suficiente para completar a metamorfose (Berven, 1979). Durante esta hibernação, as larvas deixam de se diferenciar (mudança de estágio), mas continuam o crescimento, embora a uma taxa mais lenta (Smith-Gill, 1979). A temperatura é o factor que explica maioritariamente estes comportamentos divergentes, mas poderá estar a mascarar diferenças a nível genético entre as populações (Snyder, 1956; Berven, 1979). A hereditariedade também pode ser significativa para a duração do período larvar e o tamanho na metamorfose (Berven, 1983; Travis, 1987; Blouin, 1992; Semlitsch, 1993). Ainda, em temperaturas mais elevadas, a diferenciação e o crescimento são mais rápidos, mas os indivíduos não ficam tempo suficiente na fase larvar para assimilar recursos de modo a crescer, pelo que ficam com tamanhos mais reduzidos (Atkinson, 1997).

Nas rãs verdes, é habitual os indivíduos das populações das altitudes mais elevadas terminarem a metamorfose com tamanhos mais pequenos e acelerarem o desenvolvimento quando colocados nas mesmas condições que os das altitudes baixas: foram seleccionados severamente para um desenvolvimento mais rápido devido a épocas favoráveis para o desenvolvimento mais curtas (Berven, 1979, 1982b; Laugen, 2003). O efeito genético opõe-se ao efeito ambiental de produzir girinos grandes com longos períodos larvares. Este fenómeno denomina-se *countergradient selection* (selecção contra gradiente) e foi descrito por Levins (1969), na *Drosophila melanogaster*, no qual a selecção natural favorece os genótipos que minimizam o potencial de um fenótipo induzido pelo ambiente ao longo de um gradiente. Recentemente, a *countergradient selection* é dada como explicação para a concordância, ou não, com a regra de Bergmann nas várias espécies: consoante este tipo de selecção seja mais ou menos forte, são visíveis ou não clines que respeitem a regra (Conover, 2009).

A variação contra gradiente reduz o tamanho dos indivíduos na metamorfose, o que seria contraproducente para a *fitness*. É dada como explicação a existência de um compromisso entre o tamanho do indivíduo e uma grande pressão para evitar um segundo *overwintering* por parte das larvas de montanha (Berven, 1979, 1982b). Nos

indivíduos de altitudes menores, seria igualmente contraproducente não aproveitarem manter-se no charco durante mais tempo. Deste modo, terminavam a metamorfose com tamanhos maiores, o que lhes proporcionaria vantagens em termos de *fitness*. Deverá, então, existir um compromisso com outras características. Uma taxa de mortalidade alta durante o período larvar poderá explicar tamanhos mais pequenos (Sibly, 1994). Em temperaturas mais elevadas, existe um maior risco da ocorrência de parasitas e de danos moleculares e de tecido associados a metabolismos rápidos (Sibly, 1994), aumentando a probabilidade de aparecimento de malformações durante o desenvolvimento dos girinos (Atlas, 1935). Podem também provocar dessecação e redução da concentração de oxigénio na água.

As hormonas da tiróide podem controlar a duração do período larvar. Aparentemente, as hormonas da tiróide têm concentrações muito baixas no início do desenvolvimento e aumentam em estádios mais tardios, pouco antes da metamorfose (Emerson, 1986). Estas hormonas, que controlam a metamorfose, também controlam o desenvolvimento dos membros e do crânio; assim, há razões para pensar que os tamanhos dos membros e da cabeça na metamorfose estarão associados ao crescimento e ao período larvar (Emerson, 1986). Os anuros são conhecidos por serem isomórficos, ou seja, são geometricamente semelhantes, independentemente do tamanho do corpo (Emerson, 1978), mas a isomorfia no desenvolvimento pode constranger as estratégias das histórias de vida (Jarošík, 2004).

Pelophylax perezii

Esta espécie faz parte do complexo hibridogenético *Rana* e tem uma distribuição ampla na Península Ibérica, chegando até ao sul de França (Berger, 1983). A colonização do sul de França ocorreu depois da última glaciação, sendo que o sistema *perezii ridibunda* se originou mais recentemente que os outros (Schmeller, 2005). Em Portugal, *Pelophylax perezii* (Seoane, 1885) é a espécie de anfíbio que está mais amplamente distribuída, desde as planícies do Alto Alentejo até às Minas dos Carris (1440 m), na serra do Gerês, e é a mais abundante (Ferreira, 2003). Ainda não foram realizados estudos, em Portugal, para confirmar se esta espécie forma algum tipo de complexo hibridogenético.

O sistema montanhoso da Peneda-Gerês, o qual é considerado um cruzamento biogeográfico, por possuir um clima atlântico a norte e mediterrânico a sul, é o local

adequado para o estudo da espécie *Pelophylax perezi*, ao possuir 77% da diversidade total de anfíbios em Portugal (Soares, 2005). Várias espécies de anfíbios foram dadas como presentes em vários pontos do sistema montanhoso, sendo possível estarem em simpatria e ocorrerem interações com a espécie em estudo. As espécies com que há maior probabilidade de isso acontecer serão *Alytes obstetricans*, *Bufo bufo* e *Rana iberica* (Soares, 2005).

Duas populações de *Rana iberica* do Noroeste e do centro de Espanha seguem os padrões observados na maioria dos trabalhos em que os adultos de populações de montanha têm tamanhos maiores (Esteban, 2000). Observou-se, igualmente, que estes indivíduos têm uma longevidade maior associada a um retardamento na maturidade sexual. Os indivíduos das montanhas demoram mais tempo a chegar a tamanhos semelhantes aos dos indivíduos das terras baixas devido às temperaturas ambientais baixas, de modo a obterem a mesma *fitness* (Licht, 1975; Ryser, 1996). No entanto, isto não se aplica à *Rana iberica*, que não apresenta variação na idade da maturação sexual.

Num estudo em *Pelophylax perezi*, observou-se uma diminuição no tamanho nos indivíduos do charco temporário em comparação com charcos permanentes, devido à aceleração da metamorfose nos primeiros (Álvarez, 1991).

Esta espécie inicia a reprodução tardiamente (em Maio), comparando com outras espécies de anuros, não restando muitos recursos nos charcos para os girinos, que acabam por ter uma dieta pouco variada (Diaz-Paniagua, 1985).

Objectivos

Com este trabalho pretendeu-se estudar algumas características das histórias de vida de populações da espécie *Pelophylax perezi* em função da temperatura e da origem geográfica numa perspectiva *nature/nurture*.

Para tal, analisaram-se componentes do desenvolvimento dos girinos provenientes de charcos de diferentes altitudes, de modo a determinar quais são os componentes, genéticos ou ambientais, que mais influenciam a expressão de um determinado fenótipo.

Além de se determinar, em charcos naturais, quais são as variáveis importantes para as características em estudo, efectuaram-se igualmente experiências de *common garden* no laboratório, em que se alterou apenas a temperatura.

Material e Métodos

Populações experimentais

Este estudo foi efectuado com populações de *Pelophylax perezi* de oito charcos de altitudes diferentes (de 236 m a 1200 m), localizados no sistema montanhoso da Peneda-Gerês (**Figura 2**. Ver o **Anexo I** para coordenadas mais pormenorizadas e informações adicionais). No sentido de facilitar a compreensão, as letras atribuídas a cada charco estão ordenadas consoante a altitude. Os charcos são todos charcos permanentes, apesar de o charco G ter secado completamente no mês de Agosto de 2008.

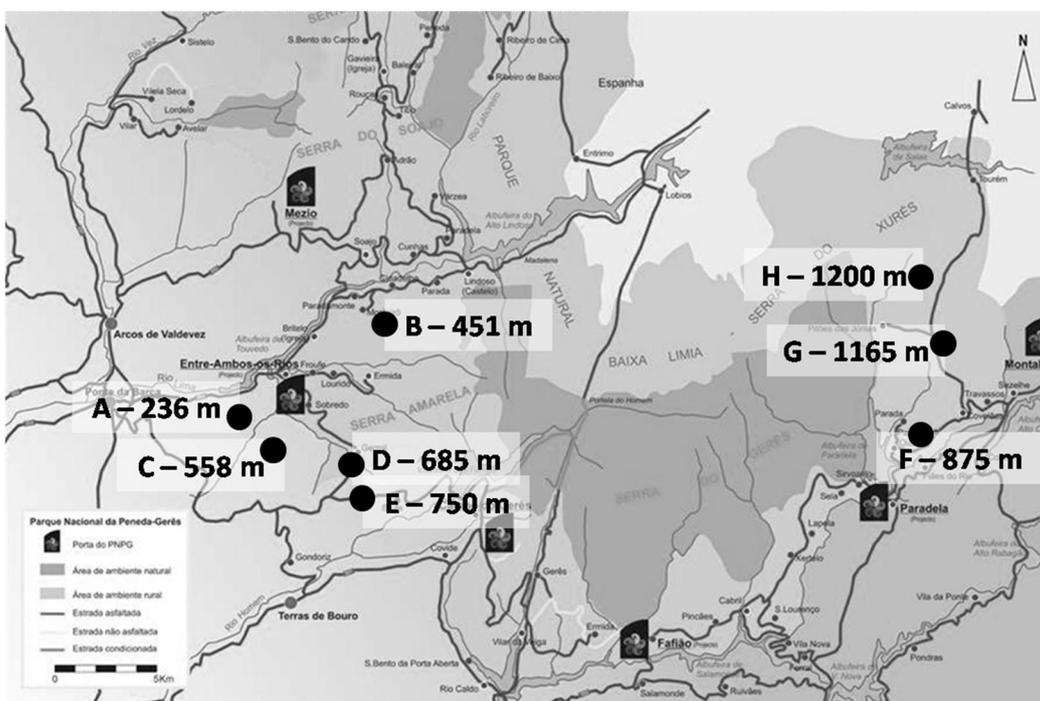


Figura 2. Mapa com a localização dos charcos e respectiva altitude.

Procedimentos de campo

Previamente à recolha de dados sobre o crescimento dos girinos, efectuou-se uma descrição das condições ambientais, como a temperatura do ar e da água, e das características dos charcos em cada local. Em cada saída de campo, efectuaram-se cinco arrastos de um metro de comprimento, em cada charco, com um camaroeiro de 20 cm de diâmetro, para os quais se definiu o local no charco e a profundidade de cada um, e

anotaram-se informações sobre a turbidez da água, composição do fundo e vegetação naquele local.

Esperavam-se obter, no mínimo, 10 girinos de *Pelophylax perezí* com os cinco arrastos. No caso de tal não acontecer, efectuaram-se outros arrastos em todo o charco, até se atingir o total de 10 girinos ou, no máximo, durante 30 minutos.

O estágio de desenvolvimento de cada girino foi determinado de acordo com os critérios de Gosner (1960) (**Anexo II**). Os girinos foram fotografados para posteriores medições e colocados numa proveta graduada para determinação do tamanho do corpo por deslocamento volumétrico. Os animais recolhidos foram devolvidos ao local de origem imediatamente após medição destas características.

Cada saída de campo teve a duração de uma semana, tendo estas sido realizadas mensalmente entre Agosto de 2008 e Maio de 2009, à excepção do período entre Novembro de 2008 e Fevereiro de 2009, quando as condições climáticas não permitiram o acesso aos charcos.

Recolha do material biológico e manutenção no laboratório

Em cada charco, foram recolhidos ovos e girinos de *Pelophylax perezí* de locais distantes uns dos outros, de modo a aumentar a probabilidade de pertencerem a posturas de indivíduos diferentes. Como se estuda a população como um todo, este procedimento possibilita uma amostragem mais representativa do conjunto dos genes de cada população dos charcos. Depois de identificados, e recolhidos através de um camaroeiro, os ovos e os girinos foram armazenados, dentro de água, numa caixa que permitia a passagem de ar. A qualidade da água, que se entende como a ausência de fungos e um arejamento adequado, foi verificada diariamente até ao seu transporte para o laboratório.

O transporte até ao laboratório foi fatal para grande parte dos indivíduos. Restaram, assim, 5 réplicas para os charcos D e F, 4 réplicas para o charco E, 2 réplicas para o G e 1 réplica de B, sendo que os indivíduos de B morreram todos na quarta semana do *design* experimental. A replicação é importante para eliminar os efeitos da deriva genética como causa de divergência genética entre populações.

Os girinos foram mantidos em condições iguais até ao estágio 25 (Gosner, 1960), sendo, de seguida, colocados nos aquários de teste.

A manutenção dos girinos, no laboratório, consistiu na colocação dos indivíduos em aquários transparentes com água envelhecida, anti-cloro e arejamento. A água foi

trocada duas vezes por semana, em que uma das trocas era efectuada no dia em que se retiravam os girinos dos aquários para a medição semanal. Os girinos foram alimentados *ad libitum* com comida para peixes Sera[®] (composição: 46,2% de proteína; 6,2% de gordura; 3,7% de fibras; 11,2% de cinza). Os indivíduos foram sujeitos a um fotoperíodo de 14L:10E, em que as luzes se mantinham ligadas das 8h às 22h. A temperatura da água dos aquários e a do laboratório foram monitorizadas ao longo da experiência.

Testes no laboratório

Para determinar se os genótipos das várias altitudes são diferentes, girinos dos cinco charcos foram colocados sob as mesmas condições ambientais em termos de densidade, alimentação, temperatura e volume de água. Dez girinos de cada replicado foram colocados em recipientes quadrados com as dimensões de 12x12 cm e altura de 20 cm, que, por sua vez, foram colocados em banho-maria nos aquários que continham água a 24°C (será referida como a temperatura baixa) (**Figura 3**). Os recipientes tinham furos, de modo a permitir a passagem de água entre os recipientes e o aquário. A altura da água era de 15 cm, o que corresponde a um volume de água, em cada recipiente, de 2160 cm³. Este volume de água é suficiente para não induzir *stress*, devido à alta densidade, e diminuir a taxa de mortalidade (Martínez, 1996).

Para testar se a temperatura pode ser um dos factores que explica variações encontradas nas histórias de vida dos girinos entre os locais, a experiência anterior foi também realizada, colocando 10 girinos de cada replicado a 28°C (será referida como a temperatura alta) por meio de termostatos (**Figura 3**). Acima dos 28°C, muitas espécies mostram inibição do crescimento (Smith-Gill, 1979), embora Atlas (1935) afirme que os girinos entram em *stress* e formam anomalias a partir de 30-32°C.

Foram fotografados, semanalmente, 6 girinos, amostrados ao acaso, de cada réplica, dos dois níveis de tratamento, como também se determinou o estágio de desenvolvimento e o volume para cada um deles. No caso de completarem a metamorfose (estádio 46), os indivíduos eram retirados dos aquários e da análise.

Todos os girinos que sobreviveram até ao final do estudo foram devolvidos aos charcos de origem, de modo a respeitar o protocolo estabelecido com o Parque Nacional da Peneda-Gerês e o Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade.

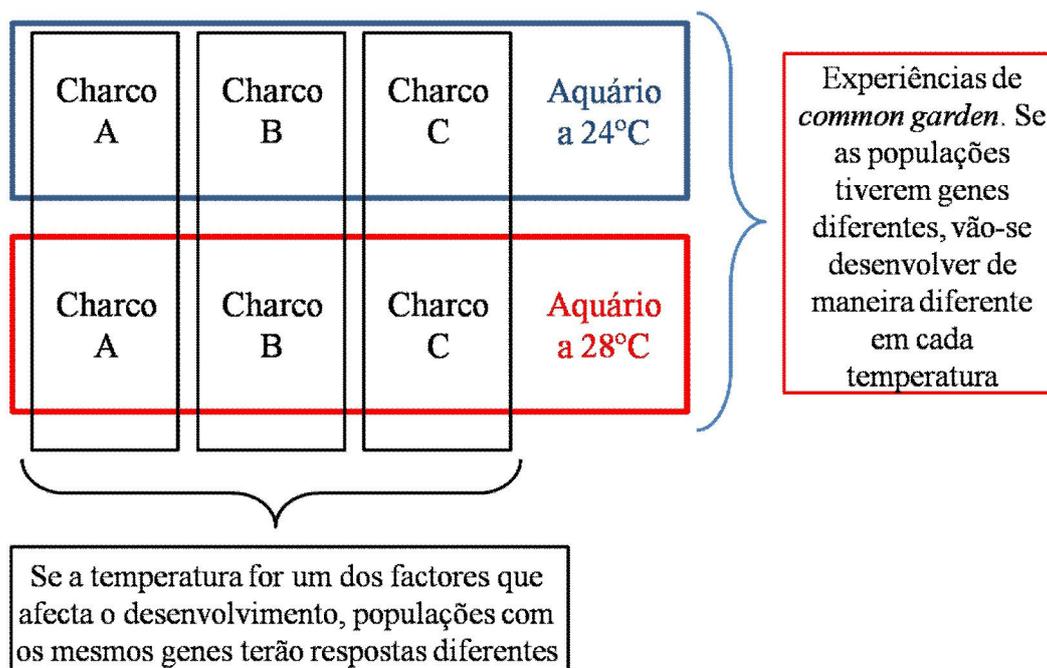


Figura 3. Esquema exemplificativo da experiência conduzida no laboratório.

Recolha e análise dos dados

Tanto os girinos observados no campo como os recolhidos e usados no laboratório foram fotografados sobre papel milimétrico com uma máquina digital Canon PowerShot A95, e medidos através do programa ImageJ 1.49g.

Tiraram-se fotografias de maneira a obter o eixo ântero-posterior lateral e o dorsal de cada indivíduo (**Figura 4**). Com o primeiro, foi possível medir o comprimento total, que corresponde à medida da distância linear entre a ponta da cabeça e da cauda; o tamanho da “cabeça” (será o corpo da rã depois da absorção da cauda), que corresponde à distância entre a ponta da cabeça e o início da linha formada pela conexão dos miótomos da cauda; a altura da região muscular da cauda (RMC), que corresponde a uma medida perpendicular à linha formada pelos miótomos da cauda e tem início na intercepção da parte inferior da musculatura caudal com a cabeça; e a altura máxima da membrana caudal (MC). A fotografia do eixo ântero-posterior dorsal permitiu obter medições da largura da RMC e da distância inter-orbital, que corresponde à medida entre o centro das pupilas (McDiarmid, 1999). As informações, referentes aos girinos, recolhidas no campo, também servem de referência e de base de comparação com os resultados que foram obtidos no laboratório.

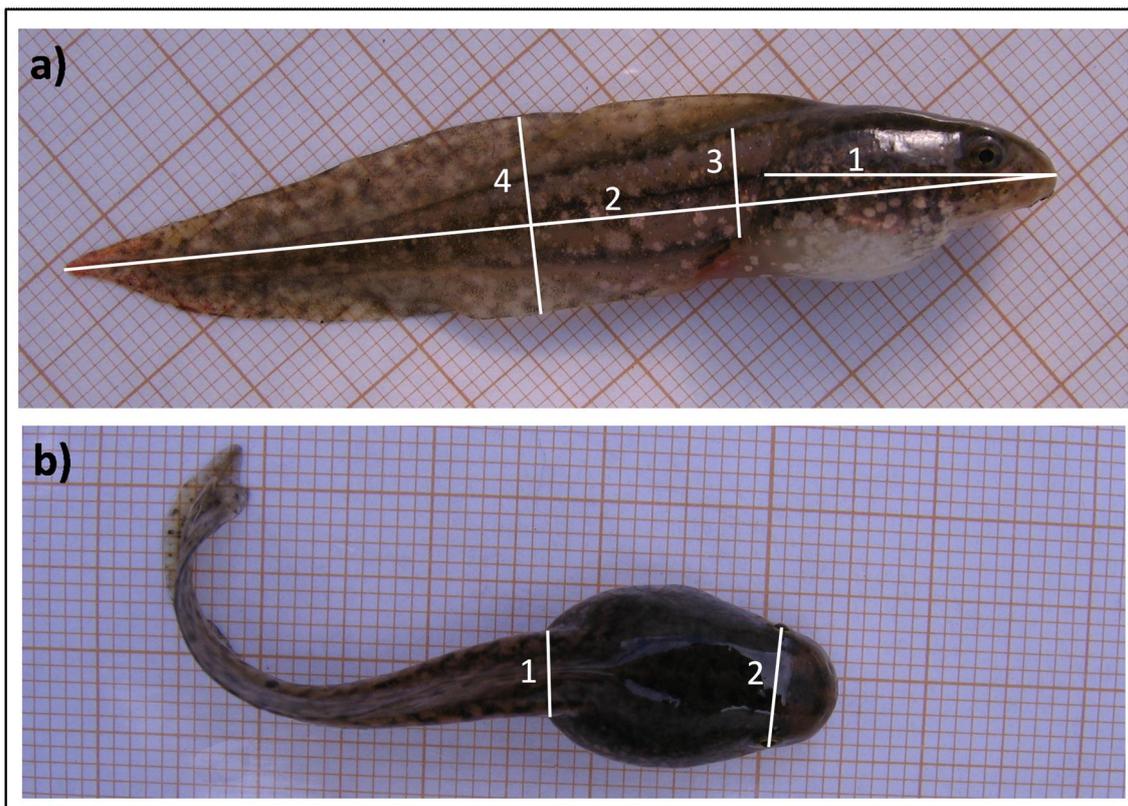


Figura 4. Parâmetros morfológicos medidos ao longo da fase larvar. **a)** Vista lateral (**1** – Comprimento da cabeça; **2** – Comprimento total; **3** – Altura da RMC; **4** – Altura da MC). **b)** Vista dorsal (**1** – Largura da RMC; **2** – Distância inter-orbital).

Para as análises estatísticas recorreu-se ao *software* de análise de dados SPSS Statistics 17.0, tendo sido considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Confirmou-se a normalidade dos dados com os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e se a simetria e o achatamento dos dados eram semelhantes ao de uma distribuição normal. No caso em que os dados violavam estes pressupostos, analisaram-se e retiraram-se *outliers* (valores discrepantes), de modo a normalizar a distribuição. Efectuaram-se análises multivariada (MANOVA) e univariada (ANOVA) da variância para dados paramétricos. Para dados não-paramétricos, efectuaram-se análises com o teste Mann-Whitney U e a sua extensão, o teste Kruskal-Wallis, bem como regressões lineares.

Resultados

Estatística descritiva

Obtiveram-se as medidas dos girinos tanto do campo (dados de cinco meses, **Anexo III**) como do laboratório (dados de seis semanas, **Anexo IV**). Após análise exploratória dos dados, identificaram-se os conjuntos que não apresentavam simetria e achatamento semelhantes aos de uma distribuição normal dos quais se retiraram *outliers*. Confirmou-se se este procedimento aproximava as medidas de dispersão às de uma distribuição normal. No caso dos dados do laboratório e para todas as variáveis, excepto a variável volume, realizaram-se testes paramétricos em que se retiraram *outliers*, o que já não se efectuou para os testes não-paramétricos que complementaram os primeiros, e para os dados do campo e as análises por regressão linear.

Retiraram-se, no máximo, três *outliers* nos dados obtidos no laboratório durante a segunda, terceira e quarta semana. Os da quinta e sexta semana não diferiam da distribuição normal em termos de assimetria e achatamento, não se retirando *outliers*, mas tanto o teste Kolmogorov-Smirnov como o Shapiro-Wilk indicaram que os dados não pertenciam a uma população com distribuição normal. Nestes casos, os resultados obtidos por análises não-paramétricas serão preferidos. Estes desvios à curva normal poderão ser explicados pelo iniciar da metamorfose nas duas últimas semanas, que proporcionou valores nas medidas relacionadas com a cauda próximos ou iguais a zero, devido à reabsorção da cauda nos girinos.

A recolha de dados semanais, no laboratório, estendia-se por dois dias. O mesmo não aconteceu na primeira semana, devido a um maior número de indivíduos em cada recipiente, bem como problemas de logística, que prolongaram a recolha de dados para quatro dias. Isto provocou discrepâncias entre as medidas obtidas a partir de girinos medidos no primeiro dia e os medidos no quarto. Sendo assim, retiraram-se sete *outliers* na primeira semana apenas para as análises paramétricas. Esta discrepância fica resolvida na análise por regressão, em que são considerados os dias como medida de tempo.

Análises dos dados de laboratório

Diferenças entre padrões populacionais podem ser atribuídas a diferenças genéticas, a diferenças ambientais ou à conjugação destes dois factores. Tradicionalmente, quando se pretende identificar a origem dessas diferenças, recorre-se a duas vias. Ou se utilizam populações geneticamente idênticas que se submetem a variações das variáveis ambientais, ou se utilizam populações geneticamente divergentes que se submetem a idênticas variáveis ambientais.

A primeira abordagem deste estudo incidiu sobre o efeito da temperatura da água dos aquários e da origem dos girinos nas seis medidas (comprimento da cabeça, comprimento total, altura da RMC, altura da MC, largura da RMC e distância inter-orbital). Para tal, aplicou-se uma MANOVA, com a qual é possível efectuar a análise de várias variáveis dependentes e perceber quais os factores que mais contribuem para a sua variação. Usou-se o teste Lambda de Wilks e obtiveram-se os valores de p na análise das medidas de tamanho dos girinos ao longo das seis semanas em que foram criados no laboratório (**Quadro 1**).

Quadro 1. Valores de p resultantes da MANOVA com a qual se testou o efeito da temperatura da água (Temperatura) e do local de origem dos girinos (Charco) nas medidas corporais em cada semana. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$.

Factor	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana
Temperatura	0,469	0,506	0,000	0,000	0,000	0,286
Temperatura*Charco	0,363	0,225	0,044	0,002	0,088	0,667

A partir da terceira semana, os girinos colocados nos dois regimes de temperatura começaram a divergir nos tamanhos corporais. Na quinta semana, a maioria dos indivíduos colocados na temperatura alta terminaram a metamorfose, quando isso aconteceu apenas na sexta semana para os da temperatura baixa. Por isso, já não se notam diferenças significativas entre as temperaturas na sexta semana, em que restaram uns poucos girinos atrasados da temperatura alta que estavam prestes a acabar o período larvar na mesma altura que os da temperatura mais baixa, sendo semelhantes em termos de tamanhos.

A interacção entre a temperatura e o charco permite analisar os comportamentos das variáveis entre os charcos dentro de cada temperatura. Quando a temperatura é mantida constante, os valores de p indicam que os girinos dos diferentes charcos não cresceram da mesma maneira na terceira e quarta semana.

Efectuou-se uma análise mais fina destes resultados através de uma ANOVA, que permitiu perceber quais as variáveis morfológicas afectadas em cada temperatura e quais se comportaram de modo diferente entre os charcos, ao ponto de provocarem estes resultados significativos. Esta análise foi complementada pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, devido à falta de normalidade dos dados já explicada anteriormente. Os dois tipos de métodos não discordam, na maioria dos casos (**Quadro 2** e **Quadro 3**).

Analizou-se cada variável morfológica individualmente para perceber como eram afectadas pelas duas temperaturas estudadas (**Quadro 2**).

Quadro 2. Valores de p obtidos pela ANOVA (P – teste paramétrico) e pelo teste Kruskal-Wallis (NP – teste não-paramétrico) com os quais se testou o efeito da temperatura da água no desenvolvimento dos girinos com todos os charcos confundidos. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$.

	Método	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana
Comprimento da cabeça	P	0,247	0,942	0,000	0,016	0,176	0,084
	NP	0,280	0,813	0,000	0,022	0,258	0,192
Comprimento total	P	0,447	0,962	0,000	0,064	0,000	0,763
	NP	0,406	0,876	0,000	0,100	0,000	0,693
Altura da RMC	P	0,364	0,647	0,000	0,003	0,000	0,598
	NP	0,318	0,657	0,000	0,004	0,000	0,577
Altura da MC	P	0,802	0,518	0,000	0,021	0,000	0,585
	NP	0,959	0,601	0,000	0,035	0,000	0,624
Largura da RMC	P	0,825	0,243	0,000	0,424	0,000	0,368
	NP	0,930	0,204	0,000	0,298	0,000	0,284
Distância inter-orbital	P	0,675	0,506	0,000	0,502	0,000	0,987
	NP	0,560	0,920	0,000	0,750	0,000	0,864
Volume	NP	0,759	0,879	0,000	0,001	0,000	0,65

Este quadro está de acordo com o primeiro, em que os girinos das duas temperaturas começam a divergir no tamanho de todas as partes corporais a partir da terceira semana. Pelos gráficos (**Anexo V**), é possível notar um tamanho ligeiramente maior para a cabeça dos girinos criados na temperatura alta; nas medidas relacionadas com a cauda, as diferenças devem-se sobretudo à absorção desta, mais rápida nos girinos criados a 28°C; a distância inter-orbital evolui de maneira semelhante nos dois regimes, mas na terceira e quinta semana; primeiro, os da temperatura alta e, depois, os da baixa mostram dimensões maiores; e, finalmente, os girinos criados na temperatura mais elevada são mais volumosos que os da baixa e a cauda começa a regredir mais cedo, o que lhes diminui o volume à quinta semana.

A análise pela MANOVA apenas indicou diferenças entre os charcos para a terceira e quarta semana. A ANOVA, em que se analisaram as várias medidas dentro de cada temperatura, serve de análise à experiência de *common garden*, permitindo destrinçar diferenças genéticas entre os charcos que poderão indicar evoluções distintas das histórias de vida (**Quadro 3**). Os girinos parecem seguir padrões que não são iguais, segundo a sua origem geográfica, e as duas temperaturas não realçam do mesmo modo as diferenças entre os charcos.

Quadro 3. Valores de p obtidos pela ANOVA (P – teste paramétrico) e pelo teste Kruskal-Wallis (NP – teste não-paramétrico) com os quais se testou o efeito da origem dos girinos no seu desenvolvimento em cada temperatura. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$.

		Método	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana	
Temperatura alta	Comprimento da cabeça	P	0,302	0,047	0,381	0,000	0,000	0,967	
		NP	0,261	0,066	0,563	0,000	0,009	0,643	
	Comprimento total	P	0,344	0,026	0,188	0,000	0,194	0,393	
		NP	0,222	0,044	0,421	0,000	0,066	0,355	
	Altura da RMC	P	0,530	0,042	0,226	0,000	0,411	0,367	
		NP	0,437	0,035	0,359	0,001	0,320	0,411	
	Altura da MC	P	0,005	0,088	0,181	0,000	0,370	0,316	
		NP	0,011	0,098	0,270	0,000	0,270	0,411	
	Largura da RMC	P	0,575	0,022	0,061	0,000	0,823	0,519	
		NP	0,730	0,024	0,397	0,009	0,829	0,355	
	Distância inter-orbital	P	0,046	0,019	0,365	0,000	0,100	0,494	
		NP	0,064	0,018	0,598	0,000	0,023	0,643	
	Volume		NP	0,069	0,039	0,690	0,002	0,006	0,411
	Temperatura baixa	Comprimento da cabeça	P	0,564	0,161	0,010	0,023	0,000	0,008
NP			0,171	0,134	0,006	0,025	0,000	0,006	
Comprimento total		P	0,602	0,041	0,002	0,038	0,011	0,214	
		NP	0,092	0,025	0,001	0,027	0,000	0,340	
Altura da RMC		P	0,140	0,400	0,045	0,132	0,533	0,305	
		NP	0,054	0,238	0,028	0,088	0,202	0,331	
Altura da MC		P	0,213	0,140	0,001	0,051	0,120	0,251	
		NP	0,098	0,130	0,000	0,036	0,003	0,265	
Largura da RMC		P	0,710	0,223	0,017	0,178	0,107	0,228	
		NP	0,502	0,147	0,011	0,133	0,210	0,302	
Distância inter-orbital		P	0,143	0,741	0,008	0,005	0,001	0,102	
		NP	0,063	0,517	0,003	0,002	0,001	0,086	
Volume		NP	0,498	0,029	0,020	0,038	0,000	0,113	

O comprimento da cabeça, quando analisado em conjunto com os gráficos (**Anexo VI**), parece seguir o padrão da altitude em que, a partir da quarta semana, os indivíduos dos charcos mais elevados têm tamanhos maiores e os dos mais baixos, tamanhos mais pequenos. Os indivíduos do charco G (1165 m; charco de altitude mais elevada analisado no laboratório) aumentaram radicalmente de tamanho. No comprimento total,

obtém-se o mesmo padrão. Nas restantes medidas da cauda, não se notam grandes diferenças entre os charcos, apenas os tamanhos do charco G voltam a distanciar-se das outras. Observam-se diferenças na primeira semana para a altura da MC. A membrana da cauda é bastante sensível e pode ser facilmente danificada, o que altera a sua altura. A distância inter-orbital não mostra um padrão claro, embora a medida do charco G continue maior na temperatura alta. Os dois charcos mais elevados mostram volumes maiores que os charcos mais baixos nos dois regimes de temperatura, além de que os indivíduos do charco G tiveram um grande aumento nesta medida.

Podem existir diferenças nas taxas de crescimento entre os charcos, mas, como o crescimento depende da taxa de diferenciação (Smith-Gill, 1979), analisou-se a evolução dos estádios ao longo das seis semanas de experiências. Observaram-se diferenças significativas nos estádios, entre as duas temperaturas, a partir da terceira semana (**Quadro 4**), como acontecia para os tamanhos. Diferentes taxas de diferenciação podem estar por detrás das diferenças nos tamanhos entre temperaturas.

Quadro 4. Valores de p obtidos pela ANOVA (P – teste paramétrico) e pelo teste Kruskal-Wallis (NP – teste não-paramétrico) com os quais se testou o efeito da temperatura da água na diferenciação dos girinos com todos os charcos confundidos. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$.

Método	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana
P	0,952	0,609	0,000	0,000	0,000	0,573
NP	0,891	0,773	0,000	0,000	0,000	0,753

Na análise dos estádios em cada temperatura, observa-se que não existem diferenças significativas entre os charcos para a temperatura baixa (todos os valores de $p > 0,05$); na temperatura alta, existem diferenças significativas entre os charcos para a segunda semana ($F=5,561$; $p=0,000$) e a terceira semana ($F=4,371$; $p=0,003$) (**Figura 5**). Nota-se um padrão em que os charcos de baixas altitudes avançam de estágio mais depressa e os de altas altitudes mais devagar. O charco G parece o mais lento, o que poderá estar relacionado com os tamanhos maiores que exibiu.

A taxa de diferenciação explica 95% da variação na duração do período larvar (Smith-Gill, 1979). Sendo assim, analisou-se o comprimento do período larvar e o tempo que os indivíduos demoravam até iniciar a metamorfose (estádios 42-43), entre as temperaturas com o teste Mann-Whitney U, e entre os charcos pelo teste Kruskal-Wallis. Retirou-se o charco B da análise por não ter atingido nenhum desses estádios.

A duração do período larvar foi claramente diferente entre os dois regimes de temperatura (Mann-Whitney $U = 907,500$; $n_1 = 57$; $n_2 = 76$; $p = 0,000$ bicaudal), tendo este sido de 29,91 dias na temperatura alta e 34,46 dias na temperatura baixa, para a metamorfose se completar. Em cada temperatura, não se observaram diferenças significativas entre os charcos (temperatura alta: $H = 7,144$; g. l. = 3; $p = 0,067$; temperatura baixa: $H = 2,087$; g. l. = 3; $p = 0,555$) (**Figura 6.a e b**).

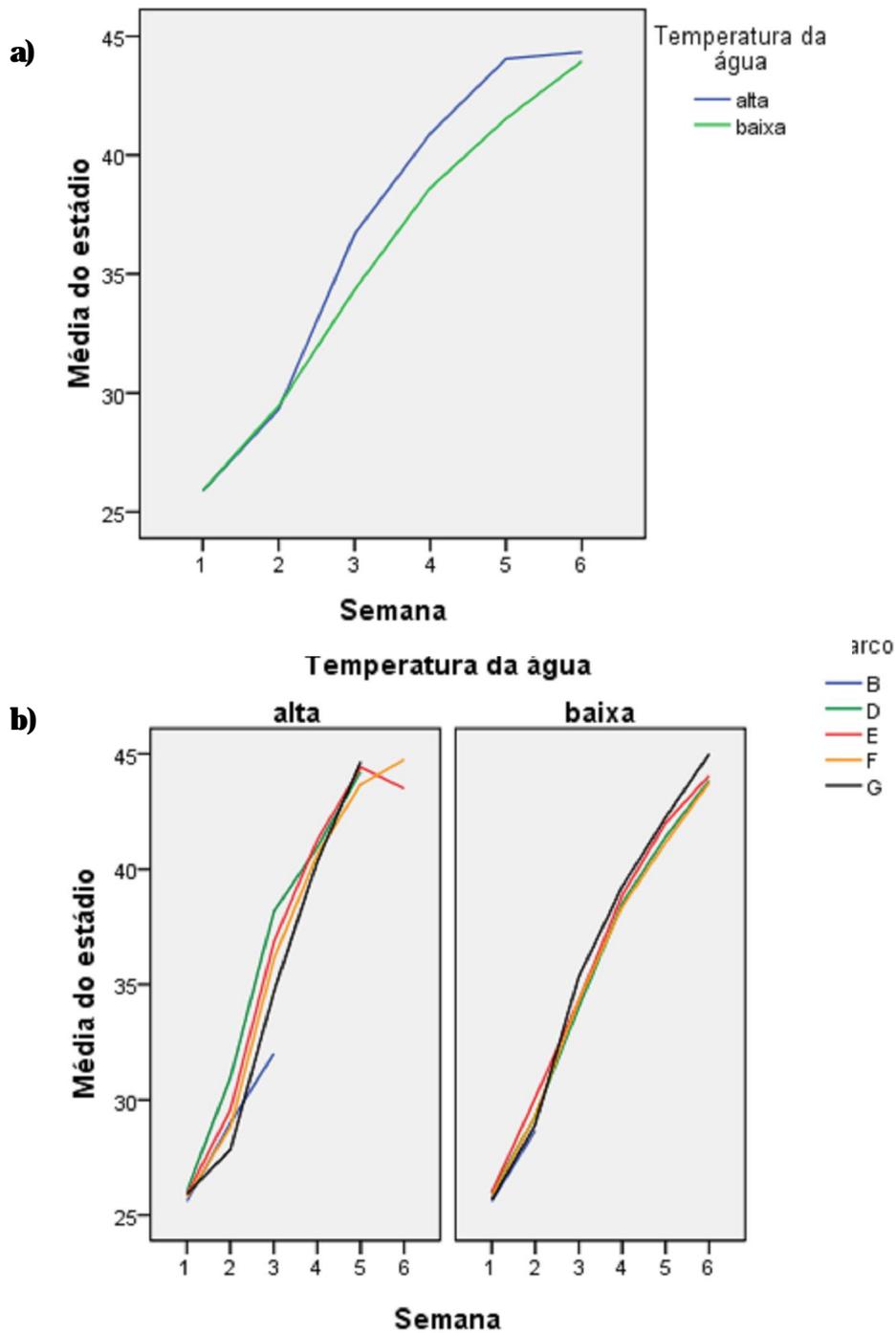


Figura 5. Gráficos da evolução dos estádios ao longo das semanas nas experiências no laboratório. **a)** Curvas de diferenciação para os dois níveis de temperatura. **b)** Curvas de diferenciação para cada charco nas duas temperaturas.

Quanto ao tempo que os girinos demoram a iniciar a metamorfose nos vários regimes, os resultados foram semelhantes. Observaram-se diferenças significativas entre as temperaturas (Mann-Whitney $U = 3,000$; $n_1 = 14$; $n_2 = 16$; $p = 0,000$ bicaudal), em que demoraram 23,399 dias até à metamorfose a 28°C e 29,722 dias a 24°C. Em cada temperatura, não se observaram diferenças entre os charcos (temperatura alta: $H = 2,226$; g. l. = 3; $p = 0,527$; temperatura baixa: $H = 1,837$; g. l. = 3; $p = 0,607$) (**Figura 6.c e d**).

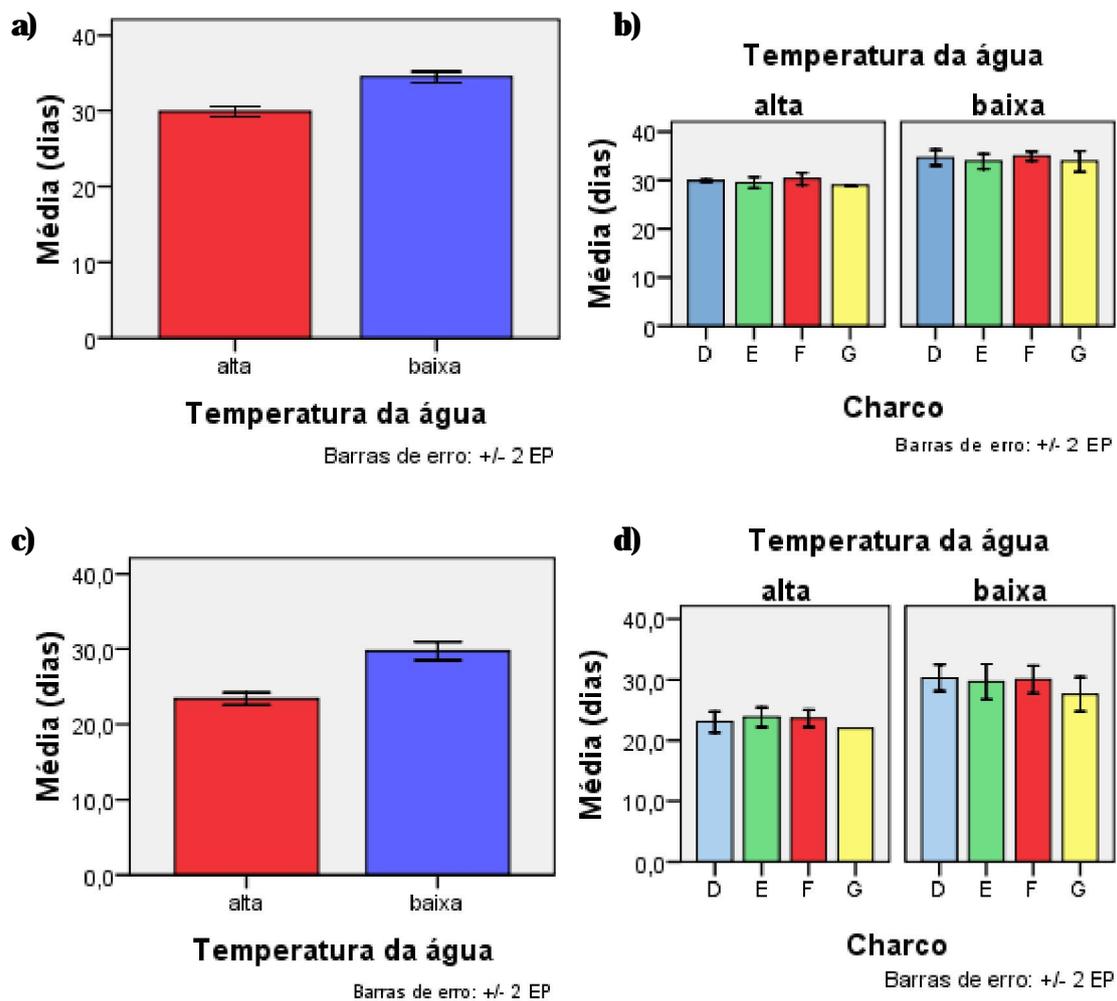
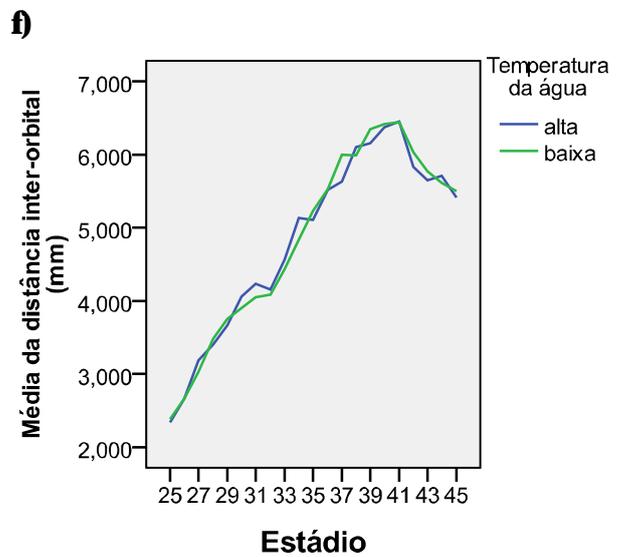
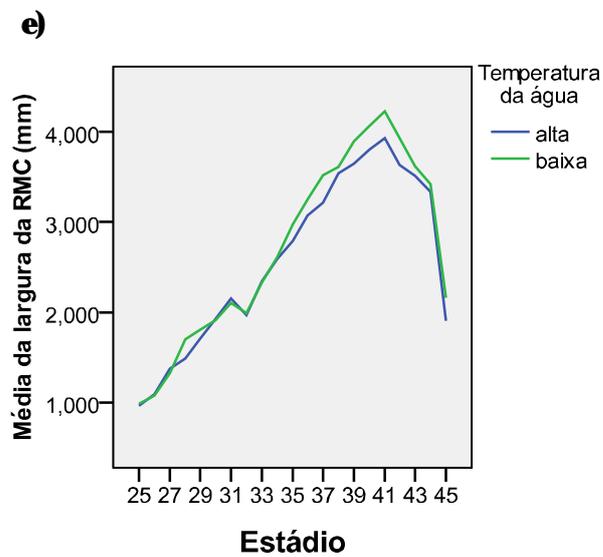
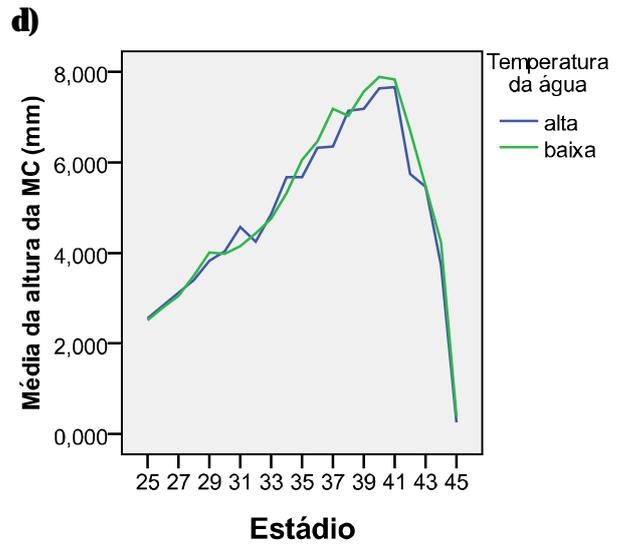
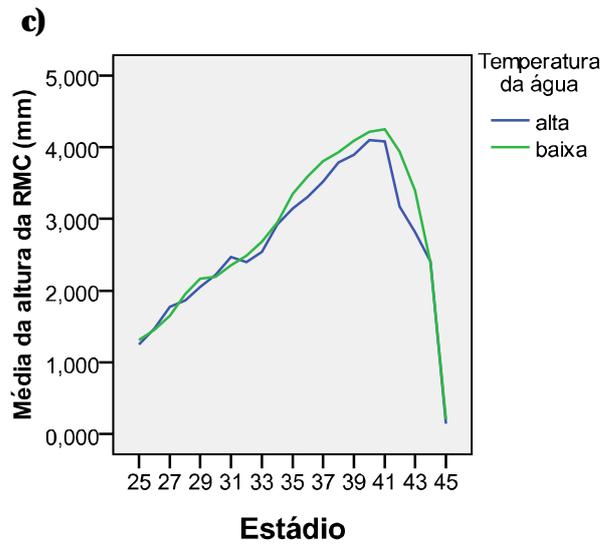
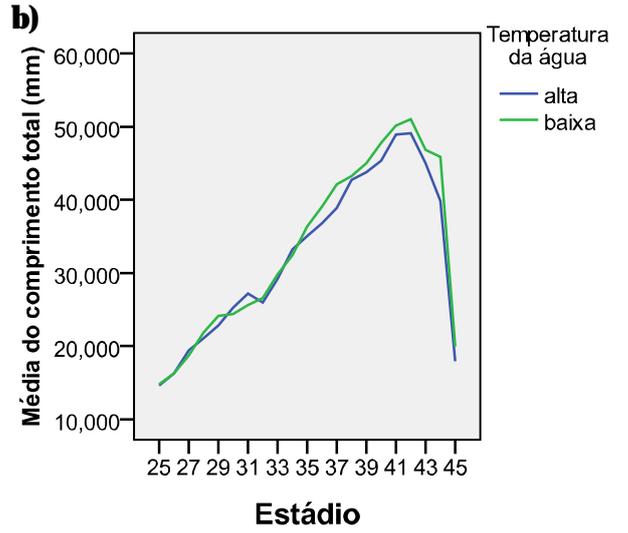
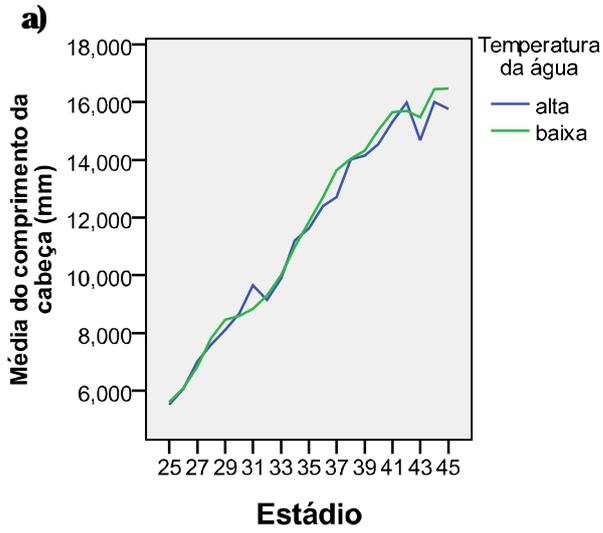


Figura 6. Gráficos das durações do período larvar e até ao início da metamorfose. **a)** Duração do período larvar para cada temperatura. **b)** Duração do período larvar para cada charco nas duas temperaturas. **c)** Duração até ao início da metamorfose para cada temperatura. **d)** Duração até ao início da metamorfose para cada charco nas duas temperaturas. EP – Erro Padrão.

De modo a verificar se existiam diferenças no crescimento em cada estágio, efectuou-se uma MANOVA consoante os estádios e detectou-se onde se encontravam as diferenças. Estas análises foram complementadas pelo teste Kruskal-Wallis. Apenas se indicou no **Anexo VII** em que estádios e temperaturas e para que variáveis se



(Continuação da Figura na página seguinte)

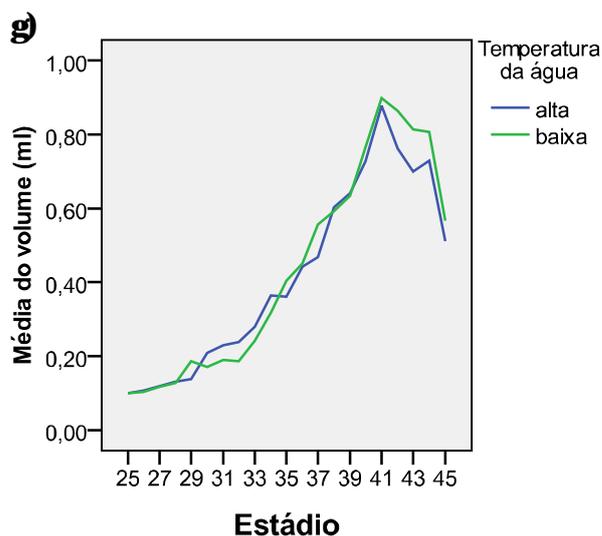


Figura 7. Curvas de crescimento ao longo do desenvolvimento (estádios) para as sete medidas estudadas dos girinos criados nos dois regimes de temperatura. **a)** Comprimento da cabeça. **b)** Comprimento total. **c)** Altura da RMC. **d)** Altura da MC. **e)** Largura da RMC. **f)** Distância inter-orbital. **g)** Volume.

observaram diferenças significativas. Quando o crescimento é analisado por estágio, não existem grandes diferenças entre os tamanhos dos girinos criados nos dois níveis de temperatura (**Figura 7**).

Em cada temperatura, não se vêem muitas diferenças significativas entre os charcos para cada estágio (**Anexo VII**). Nos gráficos (**Anexo VIII**), observa-se que os charcos se comportam de maneira semelhante. Nas duas temperaturas, é possível detectar um padrão em que os indivíduos dos charcos mais elevados têm tamanhos ligeiramente maiores, mesmo se não são significativamente maiores que os dos charcos mais baixos. Na temperatura alta, as diferenças entre os charcos são maiores e o charco G destaca-se dos outros a partir do estágio 36, em que começa a apresentar tamanhos superiores.

Regressões lineares

As diferenças dos tamanhos entre os charcos e entre as temperaturas não são significativas e as várias medidas comportam-se de maneira semelhante. Como a “cabeça” do girino corresponde ao corpo do indivíduo quando adulto, analisou-se a sua taxa de crescimento. Além disso, é uma das poucas medidas que respeita uma relação linear com os estádios, pois os valores das medidas relacionadas com a cauda, após um aumento, diminuem com o início da metamorfose, até chegarem a zero.

Sendo assim, analisaram-se, com mais pormenor, as regressões lineares obtidas a partir dos dados do campo e do laboratório, para o tamanho da cabeça, em função dos estádios. Destas regressões, retiraram-se os coeficientes das regressões que correspondem à velocidade de crescimento consoante a idade (**Anexo IX**). Estes foram comparados entre réplicas do mesmo charco, entre charcos na mesma temperatura, entre temperaturas do laboratório e entre o laboratório e o campo. Não se obtiveram resultados significativos (todos os valores de $p > 0,05$) com os testes Mann-Whitney U e Kruskal-Wallis.

Analisou-se, ainda, a taxa de diferenciação dos dois regimes de temperatura através de uma regressão linear entre a evolução dos estádios e as seis semanas de experiência no laboratório (**Quadro 5**). Obteve-se uma diferença significativa no coeficiente da regressão entre as temperaturas com o teste Mann-Whitney U (Mann-Whitney U = 0,000; $n_1 = n_2 = 4$; $p = 0,021$ bicaudal), o que confirma os resultados obtidos inicialmente, em que a taxa de diferenciação parece explicar as diferenças observadas entre os girinos colocados em níveis diferentes de temperatura. Os dados do charco B não foram usados nesta análise por não ter sido possível efectuarem-se observações para além das três primeiras semanas de experiências.

Quadro 5. Estatística descritiva da regressão linear entre os estádios e as seis semanas de trabalho experimental no laboratório.

Charco	Temperatura	Coefficiente de Pearson	Significância da correlação	R ²	Constante	Coefficiente da regressão
B	alta	0,961	0,000	0,923	25,154	0,462
B	baixa	0,951	0,000	0,904	24,578	0,511
D	alta	0,948	0,000	0,900	24,982	0,701
D	baixa	0,961	0,000	0,923	24,656	0,562
E	alta	0,949	0,000	0,901	24,244	0,713
E	baixa	0,963	0,000	0,928	24,669	0,575
F	alta	0,954	0,000	0,910	24,144	0,687
F	baixa	0,958	0,000	0,917	24,706	0,558
G	alta	0,972	0,000	0,945	23,501	0,718
G	baixa	0,978	0,000	0,956	24,610	0,609

Análises dos dados de campo

Como para os dados do laboratório, analisaram-se os dados dos tamanhos por uma medida temporal, que no campo corresponde aos meses, e pelos estádios. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis a cada mês, o qual indicou que os vários charcos apresentavam diferenças significativas nas sete medidas corporais (valores de p sempre abaixo de 0,05) (**Figura 8**).

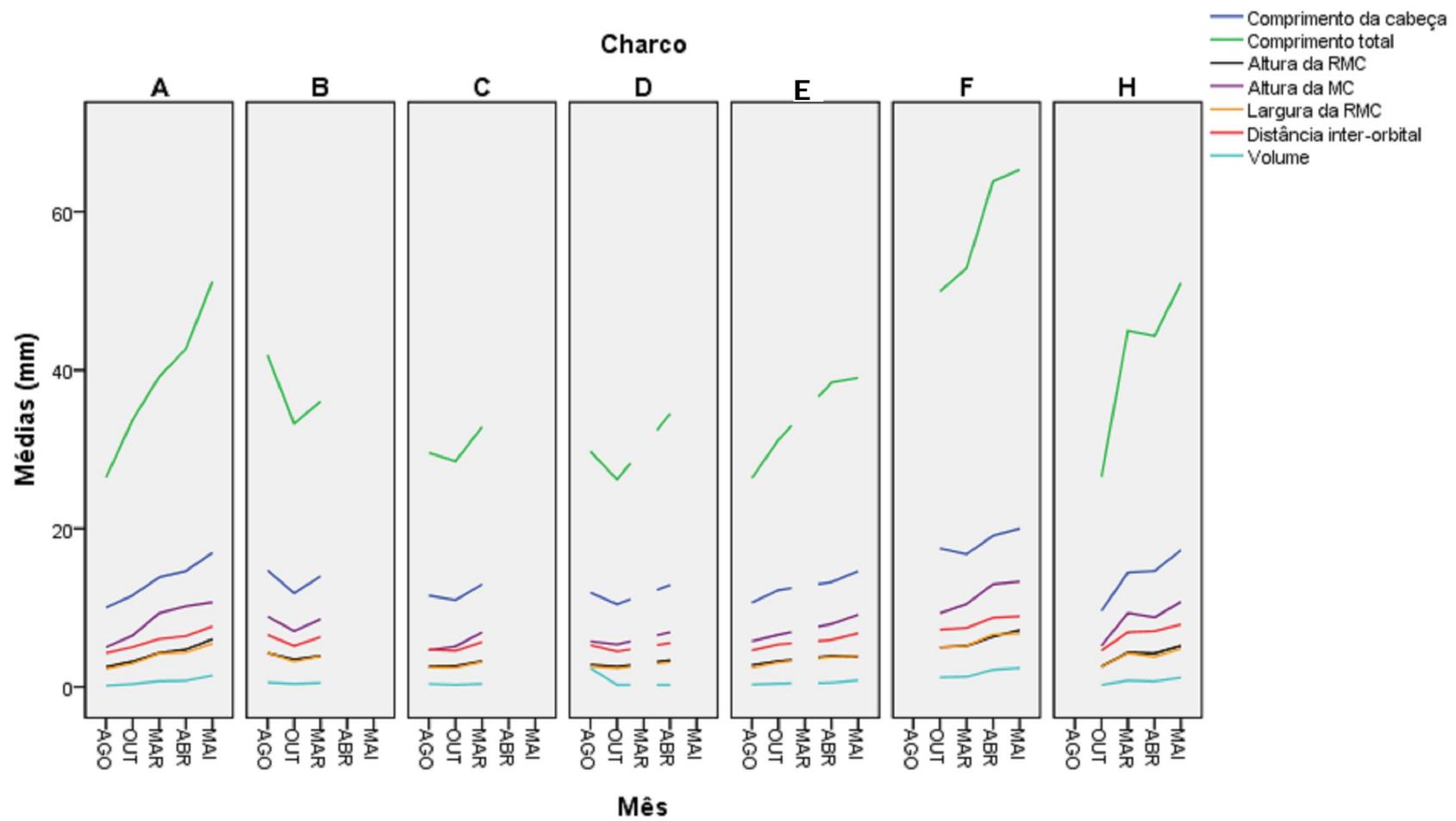


Figura 8. Curvas de crescimento das variáveis ao longo dos meses de trabalho de amostragem nos vários charcos.

Quando se analisaram os resultados consoante o estádio (do estádio 24 ao 42) e não consoante a época do ano, não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para qualquer das medidas, exceptuando nos estádios 36, 37 e 40 (**Quadro 6**).

Quadro 6. Valores de p obtidos pelo teste Kruskal-Wallis com o qual se testou o efeito da origem (charco) dos girinos no seu crescimento (dados de campo). Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$ e apenas estão indicados os estádios para os quais se observaram valores significativos.

Estádio	Comprimento da cabeça	Comprimento total	Altura da RMC	Altura da MC	Largura da RMC	Distância inter-orbital	Volume
36	0,014	0,021	0,010	0,013	0,016	0,024	0,156
37	0,038	0,051	0,045	0,035	0,094	0,054	0,039
40	0,040	0,079	0,040	0,040	0,040	0,121	0,036

Observa-se a formação de dois grupos a partir do estádio 34 (**Figura 9**). Um dos grupos é formado pelos indivíduos com tamanhos maiores, que correspondem aos charcos A, F e G; e um segundo grupo correspondente aos charcos B, C, D e E, que têm indivíduos mais pequenos.

Como não parece haver muitas diferenças nos tamanhos entre os charcos com a análise por estádio, mas apenas por mês, pode pensar-se que o que varia é o tempo no desenvolvimento consoante a localidade e altura do ano. Por isso, analisou-se a evolução dos estádios, visto que a diferenciação já parecia estar por detrás das diferenças observadas no laboratório (**Quadro 7 e Figura 10**).

Quadro 7. Valores de p obtidos pelo teste Kruskal-Wallis com o qual se compararam os estádios presentes nos charcos em cada mês como a variação dos estádios em cada charco ao longo dos meses. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$.

Mês	Valor de p	Charco	Valor de p
Agosto	0,010	A	0,035
Outubro	0,000	B	0,022
Março	0,371	C	0,114
Abril	0,004	D	0,023
Maio	0,135	E	0,413
		F	0,124
		H	0,068

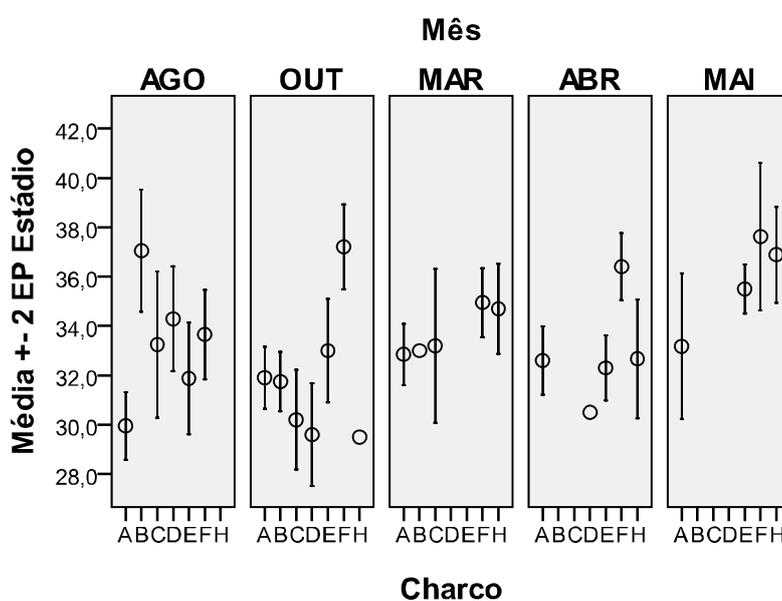


Figura 10. Evolução dos estádios no campo, ao longo dos meses, para cada charco. EP – Erro Padrão.

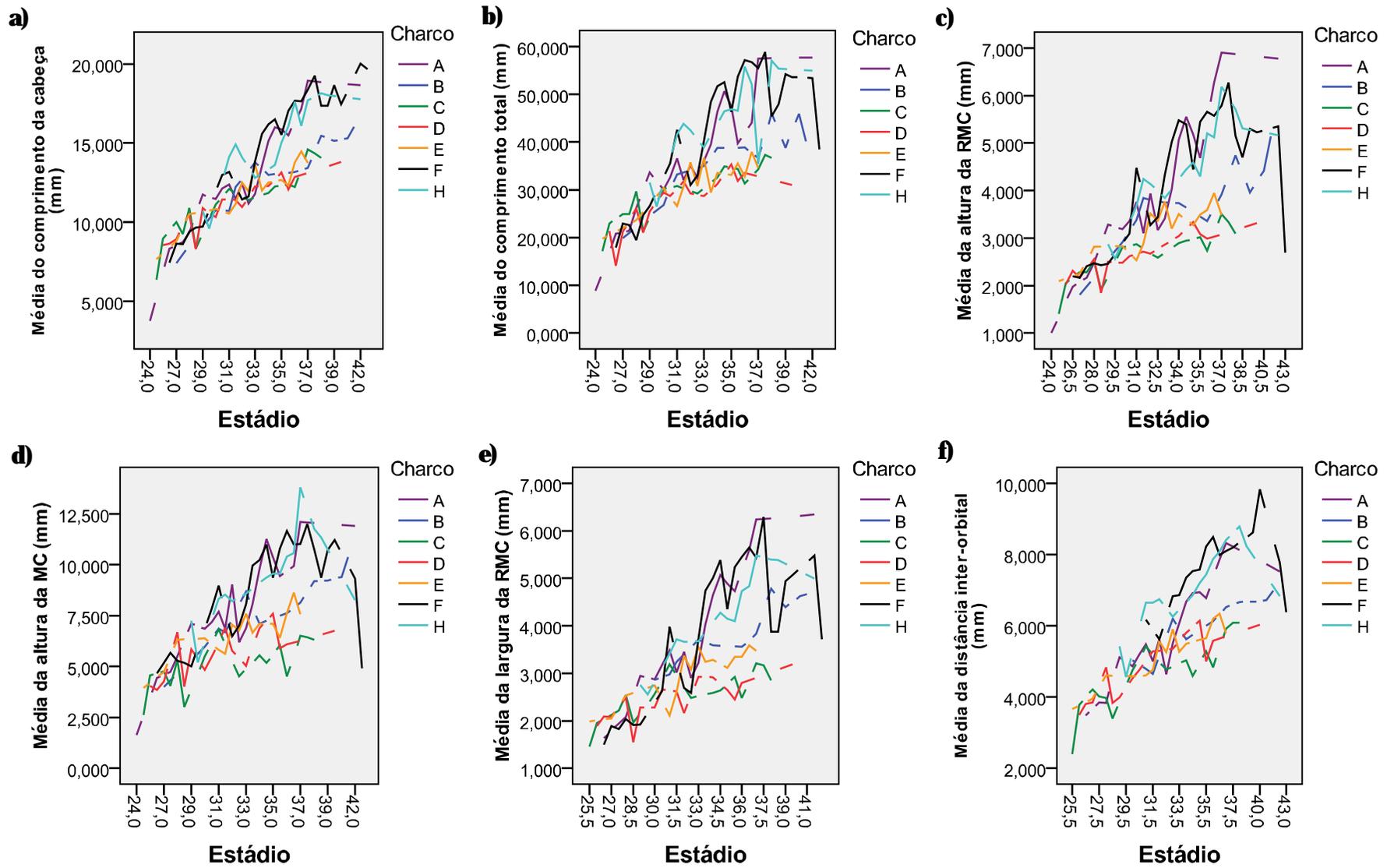


Figura 9. Curvas de crescimento ao longo dos estádios para os indivíduos estudados no campo. **a)** Comprimento da cabeça. **b)** Comprimento total. **c)** Altura da RMC. **d)** Altura da MC. **e)** Largura da RMC. **f)** Distância inter-orbital.

Nos meses em que faltam dados, não se capturaram girinos, porque já se tinham todos metamorfoseado ou tratou-se de um artefacto da técnica (**Figura 10**). Não se nota um padrão claro na evolução dos estádios. Pode concluir-se que os girinos parecem hibernar em todas as altitudes.

Para perceber se existe diferenciação e/ou crescimento mesmo nos meses de Inverno, em que as temperaturas abaixo de 10°C não permitiriam taxas rápidas de crescimento e parariam a diferenciação (Smith-Gill, 1979), efectuaram-se análises suplementares aos tamanhos e aos estádios (**Quadro 8**). Compararam-se, em cada charco, as sete medidas em estudo e os estádios de dois meses consecutivos, dois a dois, com o teste de Mann-Whitney U. A dinâmica de crescimento parece ser semelhante nas várias altitudes, embora pareça que, entre Agosto e Outubro, as taxas de diferenciação e de crescimento são maiores que nos meses seguintes.

No charco A, a diferenciação é lenta e contínua, mas o crescimento dos girinos, de Agosto a Março, é significativa, mesmo se durante o Inverno. No charco B, tem-se uma diminuição significativa do valor dos estádios e dos tamanhos, entre Agosto e Outubro. O facto de terem aparecido estádios mais baixos no mês de Outubro pode ser explicado pelo facto de os indivíduos dos estádios mais avançados, em Agosto, já terem terminado o estágio larvar antes de Outubro, restando os girinos mais atrasados. O desenvolvimento deixa de ser significativo no Inverno. No charco C, tem-se uma situação semelhante, mas o crescimento significativo é visível, apenas, entre Outubro e Março, não exibindo hibernação. No charco D, observa-se novamente uma diminuição significativa de estágio entre Agosto e Outubro e uma estagnação nos estádios até Abril, com um crescimento lento. No charco E, os girinos estagnam em termos de estágio e de tamanhos, havendo algum crescimento significativo entre Agosto e Outubro. No charco F, observa-se um crescimento contínuo, sendo significativo entre Agosto e Outubro e em Março e Abril. A taxa de crescimento foi, portanto, mais lenta no Inverno e em Abril, mês em que voltou a nevar e as temperaturas baixaram novamente. Neste charco, apenas se observa a diminuição dos estádios de Outubro a Março, o que poderá significar que os girinos se atrasaram mais de um mês a terminar a metamorfose, em relação aos charcos anteriores, em que a diminuição ocorria entre Agosto e Outubro. No charco G, o crescimento dos indivíduos é contínuo, e apenas significativo para o tamanho da cabeça entre Abril e Maio. A diferenciação acelerou apenas entre estes dois últimos meses.

Quadro 8. Valores de p obtidos através do teste Mann-Whitney U com o qual se compararam os dados, dos estádios e das sete medidas estudadas, de um mês de cada charco com os dados do mês seguinte. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0,05$. (NA – Não Aplicável)

Meses	Charco	Estádio	Comprimento da cabeça	Comprimento total	Altura da RMC	Altura da MC	Largura da RMC	Distância inter-orbital	Volume
Ago-Out	A	0,051	0,006	0,008	0,005	0,000	0,013	0,006	0,000
	B	0,007	0,022	0,022	0,093	0,056	0,002	0,002	0,011
	C	0,080	0,531	0,683	0,765	0,428	0,978	0,567	0,080
	D	0,006	0,069	0,169	0,134	0,525	0,134	0,037	0,002
	E	0,497	0,123	0,036	0,025	0,140	0,003	0,043	0,123
	F	0,064	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000	NA	0,002
	H	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Out-Mar	A	0,426	0,002	0,036	0,001	0,000	0,000	0,002
B		0,571	0,286	0,571	0,286	0,571	0,286	0,286	0,571
C		0,119	0,033	0,066	0,033	0,001	0,004	0,008	0,098
D		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F		0,036	0,283	0,497	0,923	0,203	0,923	0,722	0,974
H		0,364	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182
Mar-Abr		A	0,796	0,353	0,143	0,218	0,075	0,684	0,247
	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	F	0,247	0,035	0,009	0,000	0,000	0,007	0,003	0,002
	H	0,217	0,937	0,811	0,692	0,573	0,692	1,000	0,692
	Abr-Mai	A	0,235	0,138	0,259	0,122	0,841	0,002	0,000
B		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E		0,095	0,190	0,857	0,857	0,190	0,857	0,381	0,095
F		0,454	0,454	0,635	0,076	0,839	0,839	0,635	0,454
H		0,036	0,036	0,209	0,064	0,100	0,064	0,145	0,100

Discussão

Comparação das histórias de vida no laboratório

As características da história de vida estudadas não apresentam uma adaptação genética local, mas, sim, uma plasticidade fenotípica à temperatura. Esta conclusão é consistente com trabalhos anteriores, nos quais se verificou que a maioria da variação nas histórias de vida era explicada pelo efeito da temperatura durante a ontogenia (Snyder, 1956; Berven, 1979; Berven, 1982b; Howard, 1985).

O que se observa na experiência do laboratório é um desfasamento temporal de quatro dias e meio no desenvolvimento provocado pela diferença de temperatura. Os indivíduos mantidos nos dois níveis de temperatura começaram a evidenciar taxas de diferenciação distintas, a partir da terceira semana, em que os da temperatura alta passaram a ter, em média, 2,4 estádios de avanço. A quantidade de tempo dispendida nas diferentes fases pelos indivíduos seria diferente, sendo que alguns podem ficar mais tempo na fase em que as concentrações de hormonas da tiróide são maiores. Esta heterocronia no desenvolvimento podia produzir diferenças morfológicas (Emerson, 1986), mas tal não aconteceu.

Estas diferenças na duração do período larvar e na taxa de diferenciação provocadas pela temperatura corroboram resultados obtidos anteriormente (Smith-Gill, 1979; Berven, 1982b). Onde este trabalho difere dos mesmos é no facto de não se terem encontrado, nas experiências de *common garden*, variações nas histórias de vida consoante a altitude. No caso de se terem encontrado divergências nas características do desenvolvimento larvar, consoante a origem dos girinos, era um indício de que a variação se deve a genótipos diferentes e não apenas a uma adaptação fisiológica, como parece ser o caso em *Pelophylax perezi*. As durações até ao início da metamorfose e do período larvar são semelhantes, consoante o charco. Os tamanhos dos indivíduos são semelhantes em cada estádio, independentemente do charco, e não foram afectados pela temperatura.

No trabalho de Berven (1982b), indivíduos das populações de charcos mais elevados eram sistematicamente maiores em todos os estádios nas experiências de *common garden*, como também quando transplantados para os charcos das terras baixas, do que Berven conclui que também existe alguma determinação genética para estas

características dependente do local. Na experiência em que os indivíduos foram colocados em dois regimes de temperatura, temperaturas mais elevadas aceleraram o desenvolvimento, o que diminuiu o tamanho na metamorfose. Apesar de os intervalos de temperatura serem os mesmos, de 4°C, Berven (1982b) colocou os aquários a 18°C e 22°C. No presente estudo, as temperaturas usadas foram 24°C e 28°C. Talvez exista um ponto a partir do qual duas temperaturas elevadas não provocam efeitos divergentes, porque as duas são igualmente favoráveis ou desfavoráveis para a taxa de crescimento.

Smith-Gill (1979) usou temperaturas de 18°C a 28°C e chegou à conclusão de que os indivíduos criados nas temperaturas mais baixas eram maiores. Smith-Gill (1979) e Berven (1982b) usaram o volume como medida para o tamanho total dos girinos. No presente estudo, o volume comportou-se de maneira semelhante ao comprimento total.

Apesar de os tamanhos finais serem semelhantes, observam-se diferenças para os tamanhos entre e dentro das temperaturas, ao longo das seis semanas. As diferenças entre as temperaturas já foram explicadas por um crescimento mais rápido a partir da terceira semana da experiência. As diferenças dentro das temperaturas podem indicar que as taxas de crescimento de cada local não seguem o mesmo padrão, evidenciando alguma diferença genética entre as populações. Mas, quando se analisaram as regressões do tamanho da cabeça que será o corpo da rã, não se encontraram diferenças na taxa de crescimento entre os charcos. Apenas o valor do charco mais elevado analisado no laboratório, charco G, na temperatura alta, difere dos restantes. Além disso, nos gráficos do crescimento ao longo das semanas, também se nota um distanciamento dos valores desse charco em relação aos restantes.

O charco G apresenta tamanhos maiores, mas é de notar tratar-se de um charco que se torna temporário, em certos anos. Indivíduos de charcos temporários têm de acelerar a metamorfose, tornando-se mais pequenos (Crump, 1989; Álvarez, 1991; Laurila, 2002). Neste caso, pode tratar-se de uma *countergradient variation*, em que, quando colocados nas mesmas condições favoráveis de volume de água que os indivíduos dos outros charcos, os girinos destes charcos crescem mais, devido ao genótipo diferente que foi seleccionado, por se opor ao efeito ambiental de dessecação do charco ou mesmo de temperaturas mais baixas. Licht (1975) notou que os girinos de charcos mais baixos tinham o dobro do tamanho que os girinos dos charcos mais elevados. Os dois charcos eram temporários, mas os de baixas altitudes tinham outras fontes de água que permanecia sempre disponível. Chegou à conclusão que existe uma mortalidade total periódica dos girinos e que, nos anos em que isso não acontece, os

girinos “aproveitam” para crescer mais, permanecendo mais tempo nos charcos, e terem mais vantagem quando adultos, porque o tempo até à maturidade sexual fica reduzido. Poderá estar a acontecer o mesmo no charco G.

A taxa de crescimento é menos afectada pelas mudanças de temperatura que a taxa de diferenciação (Smith-Gill, 1979). O mesmo acontece neste estudo, em que não se encontraram diferenças significativas, entre os charcos, entre as temperaturas para a taxa de crescimento, mas, sim, para a taxa de diferenciação, que é mais rápida para a temperatura alta. Além disto, nesta temperatura, a evolução dos estádios varia consoante o charco na segunda e na terceira semana. Parece mesmo seguir o gradiente de altitudes, em que os indivíduos do charco mais baixo aceleraram o desenvolvimento, que os de altitude mais elevada replicam pouco tempo depois, embora os dados das regressões indiquem que as velocidades sejam semelhantes na mesma temperatura, o que vai contra a noção de *countergradient*. Sendo assim, os charcos apresentaram diferentes taxas de diferenciação a 28°C na segunda e terceira semana, o que poderá explicar as diferenças encontradas nos tamanhos na quarta semana. Na temperatura baixa, os charcos avançaram de estágio de maneira semelhante, não explicando as diferenças de tamanho encontradas, sobretudo, a partir da terceira semana.

Comparação das histórias de vida em ambiente natural

Não se observaram grandes diferenças entre os charcos em termos de tamanho, o que está de acordo com os dados do laboratório, nem em termos de estádios. Entre os meses analisados, para estas duas características, não se percebe nenhum padrão claro, muito por culpa, provavelmente, da dificuldade em se obter uma boa amostragem dos charcos, mas existem claramente diferenças observadas entre as épocas do ano estudadas.

Na análise por estágio, começam a notar-se diferenças nos tamanhos dos girinos a partir do estágio 34, com a formação de dois grupos, mas só a partir do estágio 36 surgem diferenças significativas. Num dos grupos, observam-se valores mais elevados para o tamanho dos girinos e, no segundo, valores mais baixos. Uma das explicações podia ser a altitude, visto que no primeiro grupo temos dois charcos de altitude mais elevada, ou a proximidade dos charcos, visto que os charcos F e H se encontram no lado Este do sistema montanhoso da Peneda-Gerês e os outros no lado Oeste. No entanto, o

charco A também pertence ao primeiro grupo, sendo o charco de menor altitude, e encontra-se do lado Oeste do sistema.

A ausência de diferenças genéticas entre os charcos poderia ser devida à semelhança das condições ambientais no sistema montanhoso da Peneda-Gerês, o que não proporcionaria pressões selectivas diferenciais segundo o local. Mas o Parque Nacional da Peneda-Gerês foi criado por ser considerado um cruzamento biogeográfico e a orientação e altitude variadas do relevo proporcionam uma grande diversidade de microclimas (Soares, 2005). Esperava-se, portanto, detectar grandes diferenças entre os charcos, que resultariam de diferentes pressões selectivas, mas tal não aconteceu.

Estudos anteriores demonstram diferenças entre os charcos de altitudes mais baixas e os de altitudes maiores, em que os girinos das altitudes superiores têm uma pequena janela de tempo com as temperaturas favoráveis para o desenvolvimento larvar, tendo, muitas vezes, de prolongar o período larvar em um ou dois anos (Berven, 1979). Na análise dos estádios ao longo dos meses, percebe-se que nem todos os girinos terminam a metamorfose antes do Inverno. O *overwintering* parece ser um fenómeno comum em todas as altitudes, o que poderá indicar semelhanças ambientais entre os charcos.

Analisou-se a transição de um mês para o seguinte nos dados de campo para tentar perceber se os girinos continuavam, ou não, a crescer, apesar de sujeitos a temperaturas mais baixas durante os meses de Inverno. A análise não é conclusiva, mas, aparentemente, os charcos A, F e H têm um crescimento contínuo, mas lento entre Agosto e Abril, que acelera, para os dois últimos charcos, em Maio. Para os restantes charcos, a maioria dos indivíduos consegue terminar o estado larvar antes do Inverno e as taxas de diferenciação e de crescimento parecem diminuir durante o *overwintering*, como observado noutros estudos (Smith-Gill, 1979), excepto para o charco C.

A temperatura da água deverá ser novamente responsável pelas pequenas diferenças entre os locais, porque, mesmo se o charco A se encontra na altitude mais baixa, a média de temperaturas é semelhante à dos charcos mais elevados (**Quadro 9**). Isto deve-se, provavelmente, ao coberto vegetal denso que circunda o charco, não permitindo que o Sol aqueça a água.

Quadro 9. Temperaturas da água (°C) durante o dia, consoante os charcos e os meses, e descrição do efeito do coberto vegetal na extensão de água.

	A	B	C	D	E	F	H	Média
AGO	16,5	26	21	18	15	22,5	-	19,83
OUT	13,5	18	19	20,5	17	13,5	12,5	16,29
MAR	12,5	19,5	17,5	-	-	19	16	16,90
ABR	11,5	-	-	6	5,5	2,5	4	5,90
MAI	23,5	-	-	-	16	20,5	16	19,00
Média	15,50	21,17	19,17	14,83	13,38	15,60	12,13	15,97
Coberto	sol/sombra	sol	sol	sol/sombra	sol	sol	sol/sombra	

As populações seguem estratégias diferentes no desenvolvimento ao longo do ano, visto divergirem nos tamanhos e nos estádios consoante o mês. O resultado final em termos de tamanho mantém-se, no entanto, semelhante. Com este tipo de amostragem não foi possível perceber a duração dos estádios larvares em cada local, de modo a compará-la com a obtida no laboratório. No entanto, quando comparadas as taxas de crescimento entre os indivíduos recolhidos no campo e os estudados no laboratório não se encontram diferenças significativas. O período larvar nas condições naturais poderá ser mais longo devido a constrangimentos de temperatura ao longo do ano e também do dia. Os indivíduos medidos nos charcos parecem ser ligeiramente maiores que os criados no laboratório, mas, comparativamente, observa-se uma manutenção do mesmo tamanho entre os charcos em cada estádio, com excepção dos estádios 36, 37 e 40.

Considerações

Se, dentro de uma mesma espécie, as correlações genéticas entre as características larvares variam entre populações, sendo que são herdadas diferencialmente (Berven, 1983), não é de estranhar que nem todas as componentes das histórias de vida respondam de igual modo às mesmas induções ambientais entre espécies. Ou seja, as várias características possuem níveis de plasticidade diferentes consoante os locais (Méndez, 2009). Berven (1983) demonstrou que as características estudadas tinham diferentes sensibilidades na plasticidade consoante a origem geográfica, pelo que foi sugerido que a selecção estava a actuar de maneira diferente em cada ambiente. Num dos locais, a *fitness* tinha sido maximizada pela evolução no tamanho dos indivíduos; noutro, apenas pela diminuição das taxas de desenvolvimento, quando o terceiro lugar apresentava um efeito pleiotrópico entre o tamanho do corpo e estas taxas. Além disso,

o crescimento e a diferenciação dependem de mecanismos funcionalmente distintos (Atkinson, 1994).

No presente trabalho, não parece existir hereditariedade para as características estudadas consoante o local, mas uma grande homogeneidade genética entre as populações. Observa-se uma plasticidade diferencial para as características estudadas, em que a taxa de diferenciação é induzida ambientalmente, quando o tamanho não parece possuir tanta plasticidade. Merilä (2000), apesar de ter concluído que as taxas de diferenciação e de crescimento possuíam bases genéticas diferentes consoante a latitude, observou que estas mostravam plasticidade consoante a temperatura, mas já não quanto ao tamanho na metamorfose.

Nem todos os estudos obtêm o mesmo padrão consoante a altitude. Em salamandra, na espécie de *Ambystoma macrodactylum*, indivíduos de charcos mais elevados apresentaram tamanhos maiores e, apesar de temperaturas mais baixas, um desenvolvimento mais rápido (Howard, 1985). Nos adultos, não encontraram diferenças no tamanho consoante a altitude. Em *Rana temporaria*, indivíduos adultos de populações de montanha e de terras de baixa altitude tinham o mesmo tamanho corporal, mas a taxa de crescimento continuou mais lenta em altitudes elevadas (Ryser, 1996).

Loman (2002) observa uma tendência oposta à dos padrões observados anteriormente no período larvar, num estudo em que os indivíduos dos charcos com temperaturas mais baixas apresentam tamanhos mais pequenos. Trata-se, no entanto, de um trabalho de campo em que podem estar a acontecer variadas interações com outros factores. Outro estudo, que não segue as mesmas conclusões generalistas sobre as causas da evolução das histórias de vida, afirma que a variação observada é devida à adaptação local e confere um papel menos importante à temperatura, embora estude ambientes termais (Méndez, 2009).

Esteban (2000) não encontrou diferenças no tamanho de juvenis de altitudes diferentes na espécie de *Rana iberica*. As populações são geneticamente semelhantes entre elas e só mostram resposta diferencial ao ambiente a partir da maturidade sexual. Poderá estar a acontecer o mesmo com as populações estudadas no presente estudo. Será ainda necessário confirmar, quando se tiverem analisado dados de rãs juvenis e adultas.

Num estudo com *Pelophylax perezii*, não se encontraram diferenças no tamanho de indivíduos de charcos permanentes, mas os charcos localizavam-se quase à mesma altitude (Álvarez, 1991).

Apesar de se partir do princípio de que a metamorfose depende da taxa de diferenciação e que esta vai ditar o tamanho dos girinos (Smith-Gill, 1979), existem outros modelos que vão contra a esta ideia. Para Wilbur (1973), a metamorfose depende da taxa de crescimento. Ficaria assim explicada a falta de variação nos tamanhos dos metamorfos pela existência de um tamanho mínimo necessário para iniciar a metamorfose, sendo que o tamanho dos girinos seria próximo desse valor em todos os casos.

Perspectivas futuras

Com este estudo prevalece a ideia de que as diferenças encontradas nas características das histórias de vida de populações de rãs geograficamente dispersas são induzidas ambientalmente. Não será a altitude *per se* a desencadear uma adaptação fisiológica, mas, sim, a temperatura da água, que dependerá da temperatura ambiental e do coberto vegetal.

Nos dados de campo, parece existir alguma resposta diferencial segundo os charcos para os quais terá havido um maior número de dias com temperaturas frias. Estas atrasaram a diferenciação, permitindo algum crescimento, assim explicando os tamanhos maiores. No laboratório, em vez de se comparar o desenvolvimento dos girinos em duas temperaturas quentes, poder-se-ia comparar entre uma mais fria e uma quente. Seria possível observar diferenças nos tamanhos consoante os charcos.

Não se observou uma contribuição clara da componente genética, mas poderão existir padrões dissemelhantes para as taxas de diferenciação e de crescimento para cada local. As diferenças genéticas poderão estar dissimuladas devido ao *habitat* produtivo no qual as larvas foram criadas no laboratório. Altas quantidades de alimento diminuem significativamente a duração do período larvar (Newman, 1989; Laugen, 2003). Neste estudo, os períodos larvares podem ter sido demasiado curtos, para se notarem diferenças nos tamanhos entre os locais e entre as temperaturas. Além disso, Travis (1984) notou maior variação entre o tamanho dos indivíduos quando estes eram criados

em condições de baixos níveis de alimento e, nos níveis elevados, a variação era pouca para o tamanho na metamorfose e na duração do período larvar.

Ainda são necessários mais estudos para perceber o quadro geral. A espécie *Pelophylax perezí* pertence a um complexo hibridogenético e ainda não há indicações se se pode tratar de uma espécie poliplóide. A poliploidia proporciona vantagens na adaptação a um maior leque de *habitats* e a *habitats* com condições severas (Semlitsch, 1993; Otto, 2007). Sendo assim, ter-se-ia uma explicação diferente para a pouca variação entre as altitudes.

Estudos de genética populacional permitirão perceber a estrutura genética intra e interpopulacional, como a existência, ou ausência, de migração entre os locais. Parte-se do princípio de que não existe migração, porque os charcos são geograficamente separados e isolados, mas este processo está actualmente a ser estudado, por meio de marcação dos adultos, em projecto de doutoramento no qual este trabalho se insere. Será possível saber se a migração poderá ser responsável pelas semelhanças nas estratégias entre as altitudes e se poderá estar a camuflar a selecção natural. Além disso, com os dados recolhidos ainda no âmbito desse trabalho de doutoramento, poderão ser relacionados os dados dos girinos com medições efectuadas em adultos dos mesmos charcos e comparar dados de anos consecutivos.

Idealmente, antes de se iniciarem as experiências desta natureza, deviam manter-se, pelo menos, duas gerações no laboratório, para eliminar os efeitos da plasticidade no desenvolvimento e efeitos maternos (Stearns, 1977). Manter e reproduzir uma espécie que não é um animal-modelo em cativeiro tem os seus desafios e os adultos desta espécie demoram dois a três anos a atingir a maturidade sexual, o que torna este procedimento impraticável. Além disso, quando se trabalha com histórias de vida, é necessário testar se existe algum sucesso reprodutor diferencial entre os regimes aplicados, para confirmar que o que se estudou afecta a *fitness* (Stearns, 1977). Neste caso, as diferenças não foram muitas, mas poder-se-ia testar se um período larvar mais curto é benéfico, ou não, para a *fitness* da espécie.

Para confirmar que os efeitos ambientais são a principal componente a afectar o desenvolvimento das rãs no estágio larvar, poderá ser feito um estudo à semelhança de Bonin (2006) em que se usou *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) para detectar *loci outliers* que indicam diferenciação genética pela selecção natural. No caso de não se encontrarem sistematicamente estes *loci* com comportamentos atípicos para as várias altitudes, poderíamos então descartar a hipótese de adaptação local.

Bibliografía

- Adolph, E. F. (1931) The size of the body and the size of the environment in the growth of tadpoles. *Biological Bulletin*, **61**: 350-375.
- Alpatov, W. W. (1930) Phenotypical variation in body and cell size of *Drosophila melanogaster*. *The Biological Bulletin*, **58**: 85-103.
- Álvarez, J., Salvador, A., López, P. & Martín, J. (1991) Desarrollo larvario de la rana común (*Rana perezí*) (Anura: Ranidae) en charcas temporales del Noroeste de la Península Iberica. *Doñana, Acta Vertebrata*, **18**: 123-132.
- Ashton, K. G. (2002) Do amphibians follow Bergmann's rule? *Canadian Journal of Zoology*, **80**: 708-716.
- Atkinson, D. (1994) Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Advances in Ecological Research*, **25**: 1-58.
- Atkinson, D. (1995) Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: exceptions to the general rule. *Journal of Thermal Biology*, **20**: 61-74.
- Atlas, M. (1935) The effect of temperature on the development of *Rana pipiens*. *Physiological Zoology*, **8**: 290-310.
- Beebee, T. J. C. (1995) Amphibian breeding and climate. *Nature*, **374**: 219-220.
- Berger, L. (1983) Western Palearctic water frogs (Amphibia, Ranidae): systematics, genetics and population compositions. *Experientia*, **39**: 127-234.
- Berven, K. A. (1982a) The genetic basis of de altitudes variation in the wood frog *Rana sylvatica*. I. An experimental analysis of life history traits. *Evolution*, **36**: 962-983.
- Berven, K. A. (1982b) The genetic basis of de altitudes variation in the wood frog *Rana sylvatica*. II. An experimental analysis of larval development. *Oecologia*, **52**: 360-369.
- Berven, K. A. (1990) Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology*, **71**: 1599-1608.
- Berven, K. A. & Gill, D. E. (1983) Interpreting geographic variation in life-history traits. *American Zoologist*, **23**: 85-97.

- Berven, K. A., Gill, D. E. & Smith-Gill, S. J. (1979) Countergradient selection in the green frog, *Rana clamitans*. *Evolution*, **33**: 609-623.
- Bizer, J. R. (1978) Growth rates and size at metamorphosis of high elevation populations of *Ambystoma tigrinum*. *Oecologia*, **34**: 175-184.
- Blouin, M. S. (1992) Genetic correlations among morphometric traits and rates of growth and differentiation in the green tree frog, *Hyla cinerea*. *Evolution*, **46**: 735-744.
- Bonin, A., Taberlet, P., Miaud, C. & Pompanon, F. (2006) Explorative genome scan to detect candidate *loci* for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution*, **23**: 773-783.
- Conover, D. O., Duffy, T. A. & Hice, L. A. (2009) The covariance between genetic and environmental influences across ecological gradients: reassessing the evolutionary significance of countergradient and cogradient variation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1168**: 100-129.
- Crump, M. L. (1989) Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. *Copeia*, **1989**: 794-797.
- Diaz-Paniagua, C. (1985) Larval diets related to morphological characters of five Anuran species in the Biological Reserve of Doñana (Huelva, Spain). *Amphibia-Reptilia*, **6**: 307-322.
- Emerson, S. B. (1986) Heterochrony and frogs: the relationship of a life history trait to morphological form. *The American Naturalist*, **127**: 167-183.
- Esteban, M. & Sanchiz, B. (2000) Differential growth and longevity in low and high altitude *Rana iberica* (Anura, Ranidae). *Herpetological Journal*, **10**: 19-26.
- Ferreira, M. & Crespo, E. G. (2003) Sobre a Conservação dos Anfíbios em Portugal / Amphibian Conservation in Portugal. *Munibe*, Suplemento, **16**: 74-89.
- French, V., Feast, M. & Partridge, L. (1998) Body size and cell size in *Drosophila*: the developmental response to temperature. *Journal of Insect Physiology*, **44**: 1081-1089.
- Gosner, K. L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- Hitchings, S. P. & Beebee, T. J. C. (1997) Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity*, **79**: 117-127.

- Howard, J. H. & Wallace, R. L. (1985) Life history characteristics of populations of the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*) from different altitudes. *American Midland Naturalist*, **113**: 361-373.
- Jarošík, V., Kratochvíl, L., Honěk, A. & Dixon, A. F. G. (2004) A general rule for the dependence of developmental rate on temperature in ectothermic animals. *Proceedings: Biological Sciences*, **271**, Supplement 4, S219-S221.
- Laugen, A. T., Laurila, A., Räsänen, K. & Merilä, J. (2003) Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates – evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**: 996-1005.
- Laurila, A., Karttunen, S. & Merilä, J. (2002) Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution*, **56**: 617-627.
- Leclair, Jr, R. & Laurin G. (1996) Growth and body size in populations of mink frogs *Rana septentrionalis* from two latitudes. *Ecography*, **19**: 296-304.
- Leskovar, C., Oromi, N., Sanuy, D. & Sinsch, U. (2006) Demographic life history traits of reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*) vary between northern and southern latitudes. *Amphibia-Reptilia*, **27**: 365-375.
- Levins, R. (1969) Thermal acclimation and heat resistance in *Drosophila* species. *The American Naturalist*, **103**: 483-499.
- Licht, L. E. (1974) Survival of embryos, tadpoles, and adults of the frogs *Rana aurora aurora* and *Rana pretiosa pretiosa* sympatric in southwestern British Columbia. *Canadian Journal of Zoology*, **52**: 613-627.
- Licht, L. E. (1975) Comparative life history features of the western spotted frog, *Rana pretiosa*, from low- and high-elevation populations. *Canadian Journal of Zoology*, **53**: 1254-1257.
- Loman, J. (2002) Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *Journal of Zoology*, **258**: 115-129.
- Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M. & Méndez, M. A. (2009) Effects of pond drying on morphological and life-history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research*, **11**: 803-815.
- Martínez, I. P., Álvarez, R. & Herráez M. P. (1996) Growth and metamorphosis of *Rana perezii* larvae in culture: effects of larval density. *Aquaculture*, **142**: 163-170.

- Martof, B. (1956) Factors influencing size and composition of populations of *Rana clamitans*. *American Midland Naturalist*, **56**: 224-245.
- McDiarmid, R. W. & Altig, R. (1999) *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, 24-36.
- McNab, B. K. (1971) On the ecological significance of Bergmann's Rule. *Ecology*, **52**: 845-854.
- Méndez, M. A. & Correa-Solis, M. (2009) Divergence in morphometric and life history traits in two thermally contrasting Andean populations of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Journal of Thermal Biology*, **34**: 342-347.
- Merilä, J., Laurila, A., Laugen, A. T., Räsänen, K. & Pakkala, M. (2000) Plasticity in age and size at metamorphosis in *Rana temporaria* – comparison of high and low latitude populations. *Ecography*, **23**: 457-465.
- Morrison, C. & Hero, J. M. (2003) Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology*, **72**: 270-279.
- Newman, R. A. (1989) Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, **70**: 1775-1787.
- Otto, C. R. V., Snodgrass, J. W., Forester, D. C., Mitchell, J. C. & Miller, R. W. (2007) Climatic variation and the distribution of an amphibian polyploid complex. *Journal of Animal Ecology*, **76**: 1053-1061.
- Reading, C. J., Loman, J. & Madsen, T. (1991) Breeding pond fidelity in the common toad, *Bufo bufo*. *Journal of Zoology*, **225**: 201-211.
- Reznick, D. (1996) Life history evolution in guppies: a model system for the empirical study of adaptation. *Netherlands Journal of Zoology*, **46**: 172-190.
- Roff, D. A. (2007) Contributions of genomics to life-history theory. *Nature Reviews Genetics*, **8**: 116-125.
- Ryser, J. (1996) Comparative life histories of a low- and a high-elevation population of the common frog *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia*, **17**: 183-195.
- Schmeller, D. S., Seitz, A., Crivelli, A. & Veith, M. (2005) Crossing species' range borders: interspecies gene exchange mediated by hybridogenesis. *Proceedings of the Royal Society B*, **272**: 1625-1631.

- Semlitsch, R. D. (1993) Asymmetric competition in mixed populations of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution*, **47**: 510-519.
- Semlitsch, R. D., Scott, D. E. & Pechmann, J. H. K. (1988) Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, **69**: 184-192.
- Semlitsch, R. D. & Wilbur, H. M. (1988) Effects of pond drying time on metamorphosis and survival in the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, **1988**: 978-983.
- Sibly, R. M. & Atkinson, D. (1994) How rearing temperature affects optimal adult size in ectotherms. *Functional Ecology*, **8**: 486-493.
- Smith, D. C. (1987) Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, **68**: 344-350.
- Smith, M. A. & Green, D. M. (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, **28**: 110-128.
- Smith-Gill, S. J. (1983) Developmental plasticity: developmental conversion *versus* phenotypic modulation. *American Zoologist*, **23**: 47-55.
- Smith-Gill, S. J. & Berven, K. A. (1979) Predicting amphibian metamorphosis. *The American Naturalist*, **113**: 563-585.
- Smith-Gill, S. J. & Gill, D. E. (1978) Curvilinearities in the competition equations: an experiment with rapid tadpoles. *The American Naturalist*, **112**: 557-570.
- Snyder, R. C. (1956) Comparative features of the life histories of *Ambystoma gracile* (Baird) from populations at low and high altitudes. *Copeia*, **1956**: 41-50.
- Soares, C., Álvares, F., Loureiro, A., Sillero, N., Arntzen, J. W. & Brito, J. C. (2005) Atlas of the amphibians and reptiles of Peneda-Gerês National Park, Portugal. *Herpetozoa*, **18**: 155-170.
- Stearns, S. C. (1977) The evolution of life history traits: a critique of the theory and a review of the data. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **8**: 145-171.
- Stearns, S. C. & Koella, J. C. (1986) The evolution of phenotypic plasticity in life-history traits: predictions of reaction norms for age and size at maturity. *Evolution*, **40**: 893-913.

Travis, J. (1984) Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology*, **65**: 1155-1160.

Travis, J., Emerson, S. B. & Blouin, M. (1987) A quantitative-genetic analysis of larval life-history traits in *Hyla crucifer*. *Evolution*, **41**: 145-156.

Wilbur, H. M. & Collins, J. P. (1973) Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, **182**: 1305-1314.

Anexos

Anexo I

Altitude e localização (coordenadas UTM e Serra) dos oito charcos em estudo.

Código	Altitude (m)	Coordenadas UTM*		Localização
A	236	N 41°47'49,0"	W 008°21'05,5"	Serra Amarela
B	451	N 41°50'58,4"	W 008°15'28,5"	Serra Amarela
C	558	N 41°46'30,5"	W 008°18'31,8"	Serra Amarela
D	685	N 41°46'29,8"	W 008°16'13,7"	Serra Amarela
E	750	N 41°45'59,3"	W 008°15'53,4"	Serra Amarela
F	875	N 41°47'09,9"	W 007°56'19,6"	Serra do Gerês
G	1165	N 41°50'17,3"	W 007°55'15,1"	Planalto da Mourela
H	1200	N 41°51'25,9"	W 007°55'07,6"	Planalto da Mourela

(*UTM - *Universal Transverse Mercator*)

Anexo II

Estádios embrionários e larvares dos anuros, de acordo com os critérios de Gosner (1960)

TABLE 1

1 FERTILIZATION	7 32-CELL	13 NEURAL PLATE	15 ROTATION
2 GRAY CRESCENT	8 MID-CLEAVAGE	14 NEURAL FOLDS	16 NEURAL TUBE
3 2-CELL	9 LATE CLEAVAGE	17 TAIL BUD	
4 4-CELL	10 DORSAL LIP	18 MUSCULAR RESPONSE	
5 8-CELL	11 MID-GASTRULA	19 HEART BEAT	
6 16-CELL	12 LATE GASTRULA	20 GILL CIRCULATION	

TABLE 2

21 CORNEA TRANSPARENT	22 TAIL FIN CIRCULATION
23 OPERNULUM DEVELOPMENT (23-25)	TOE DEVELOPMENT (31-37)
24	31 VI
25	32 VII
	33 VIII
	34 IX
	35 X
	36 XI
	37 XII
	38 XIII
	metatarsal tubercle
LIMB BUD (26-30)	
length : diameter	
26 I	$l < \frac{1}{2} \times d$
27 II	$l \approx \frac{1}{2} \times d$
28 III	$l \approx 1 \times d$
29 IV	$l \approx 1 \frac{1}{2} \times d$
30 V	$l = 2 \times d$

TABLE 3

39 XIV subarticular tubercles	42 XXI
40 XV XVII	43 XXII
present	44 XXIII
cloacal tail piece	tail stub
lost	45 XXIV
41 XVIII XIX	46 XXV
	metamorphosis complete

Anexo III

Estadística descriptiva dos dados de campo

Geral

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	243	3,218	22,586	13,46609	3,444560	,045	,156	-,147	,311
Comprimento total	243	8,219	74,443	38,09822	12,804383	,454	,156	-,156	,311
Altura da RMC	243	,669	8,241	3,85309	1,393893	,505	,156	-,353	,311
Altura da MC	243	1,274	15,224	7,82353	2,734809	,294	,156	-,494	,311
Largura da RMC	239	1,459	8,377	3,67203	1,393181	,739	,157	,026	,314
Distância inter-orbital	210	2,399	9,975	6,03133	1,511184	,266	,168	-,522	,334
Volume	240	,05	6,25	,8280	,92242	3,743	,157	18,370	,313

Agosto 2008

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	83	6,361	18,440	12,06718	2,856033	,169	,264	-,825	,523
Comprimento total	83	17,128	59,290	31,92376	9,226313	,603	,264	-,171	,523
Altura da RMC	83	1,402	5,300	3,14937	,960742	,579	,264	-,640	,523
Altura da MC	83	2,625	11,250	6,50796	2,064145	,557	,264	-,570	,523
Largura da RMC	82	1,459	5,211	2,83257	,888879	,646	,266	-,378	,526
Distância inter-orbital	53	2,399	7,321	5,04860	1,106109	-,055	,327	-,615	,644
Volume	83	,13	6,25	,7737	1,29588	3,761	,264	13,665	,523

Outubro 2008

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	66	7,992	19,657	12,40628	2,922391	1,071	,295	,388	,582
Comprimento total	66	14,055	57,140	33,69716	9,550367	,861	,295	,402	,582
Altura da RMC	66	1,916	6,201	3,30448	1,046495	1,314	,295	1,257	,582
Altura da MC	66	3,793	11,467	6,54581	1,904111	1,007	,295	,442	,582
Largura da RMC	66	1,721	6,288	3,15149	1,079147	1,399	,295	1,518	,582
Distância inter-orbital	66	3,334	8,453	5,28651	1,173429	,807	,295	,106	,582
Volume	66	,05	1,75	,4894	,38893	1,636	,295	1,884	,582

Março 2009

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	36	10,715	20,153	14,70361	2,271170	,255	,393	-,399	,768
Comprimento total	36	26,909	63,081	43,63172	9,250584	,259	,393	-,814	,768
Altura da RMC	36	2,795	6,092	4,39825	,860121	-,229	,393	-,662	,768
Altura da MC	36	6,042	11,865	9,27222	1,540323	-,138	,393	-,721	,768
Largura da RMC	36	2,578	6,235	4,33192	,942795	,209	,393	-,797	,768
Distância inter-orbital	36	4,918	8,618	6,62851	,971501	,233	,393	-,744	,768
Volume	36	,25	2,00	,8461	,42603	,721	,393	-,004	,768

Abril 2009

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	29	11,816	22,586	15,86868	2,925810	,770	,434	-,085	,845
Comprimento total	29	32,860	73,125	49,15198	12,427396	,598	,434	-,866	,845
Altura da RMC	29	3,270	7,001	5,04146	1,158261	,177	,434	-1,288	,845
Altura da MC	29	6,900	15,224	10,50093	2,326588	,391	,434	-,580	,845
Largura da RMC	29	3,120	8,377	4,93731	1,448412	,789	,434	-,378	,845
Distância inter-orbital	29	5,391	9,975	7,15853	1,343662	,631	,434	-,683	,845
Volume	29	,25	3,50	1,1879	,85290	1,283	,434	,944	,845

Mai 2009

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	29	3,218	21,206	15,94300	4,590754	-1,973	,434	3,488	,845
Comprimento total	29	8,219	74,443	47,86322	16,469170	-1,273	,434	1,404	,845
Altura da RMC	29	,669	8,241	5,25061	1,798820	-1,208	,434	1,468	,845
Altura da MC	29	1,274	14,692	10,02090	3,356503	-1,545	,434	2,244	,845
Largura da RMC	26	3,719	7,553	5,31596	,987204	,210	,456	-,143	,887
Distância inter-orbital	26	6,052	9,627	7,84117	,846956	-,068	,456	-,454	,887
Volume	26	,50	3,00	1,4346	,56405	,885	,456	1,204	,887

Anexo IV

Estadística descritiva dos dados de laboratório

1ª semana

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	281	4,230	8,622	6,01656	,761959	,387	,145	-,004	,290
Comprimento total	279	11,200	22,861	16,02056	2,262065	,455	,146	-,184	,291
Altura da RMC	281	,830	2,257	1,42447	,253478	,329	,145	,001	,290
Altura da MC	281	1,546	4,006	2,75430	,449570	,230	,145	-,216	,290
Largura da RMC	278	,611	1,691	1,05629	,205288	,450	,146	-,148	,291
Distância inter-orbital	281	1,076	3,724	2,59785	,411638	,013	,145	-,058	,290
Volume	281	,10	,25	,1080	,03378	3,995	,145	14,060	,290

2ª semana

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	257	5,258	12,668	8,37325	1,265530	,268	,152	,139	,303
Comprimento total	257	13,944	38,148	23,79781	4,187511	,379	,152	,264	,303
Altura da RMC	257	1,255	3,254	2,13527	,392135	,276	,152	-,210	,303
Altura da MC	255	1,913	5,900	3,87224	,804365	,224	,153	-,353	,304
Largura da RMC	255	1,022	2,774	1,81015	,374515	,314	,153	-,253	,304
Distância inter-orbital	257	2,193	5,714	3,78216	,582846	,229	,152	,360	,303
Volume	257	,10	,50	,1763	,09592	,926	,152	-,024	,303

3ª semana

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	222	7,728	15,910	11,89959	1,761889	,000	,163	-,526	,325
Comprimento total	222	21,271	48,441	35,89191	5,992780	-,103	,163	-,545	,325
Altura da RMC	221	2,020	4,678	3,26346	,564412	-,043	,164	-,674	,326
Altura da MC	222	2,905	8,932	5,93257	1,178958	-,109	,163	-,321	,325
Largura da RMC	222	1,590	5,201	2,93830	,567044	,257	,163	,244	,325
Distância inter-orbital	222	3,397	6,842	5,23368	,723256	-,110	,163	-,416	,325
Volume	222	,10	,90	,4034	,17734	,341	,163	,103	,325

4ª semana

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	214	10,801	17,847	14,52611	1,396140	-,219	,166	-,356	,331
Comprimento total	214	31,740	57,325	45,40961	5,320007	-,016	,166	-,175	,331
Altura da RMC	213	2,423	5,599	3,93965	,576388	-,147	,167	,453	,332
Altura da MC	212	3,729	10,212	7,29620	1,222980	-,497	,167	,313	,333
Largura da RMC	213	2,558	4,835	3,75961	,454731	-,018	,167	-,433	,332
Distância inter-orbital	213	4,612	7,697	6,16765	,552097	-,084	,167	-,113	,332
Volume	214	,25	1,40	,7030	,20991	,433	,166	-,189	,331

5ª semana

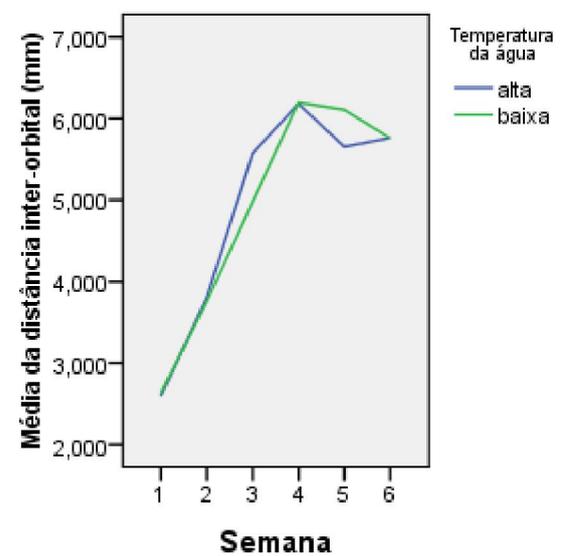
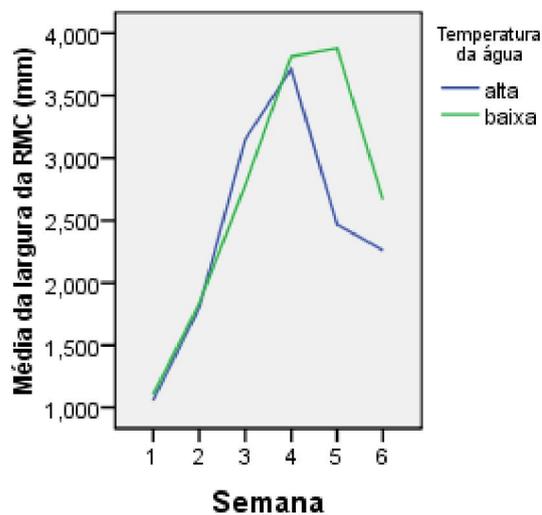
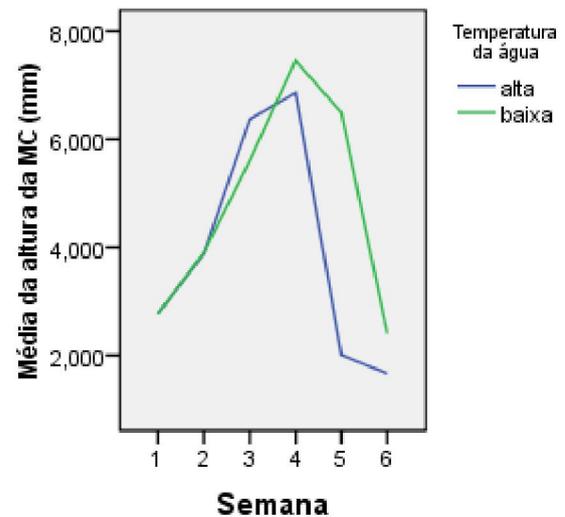
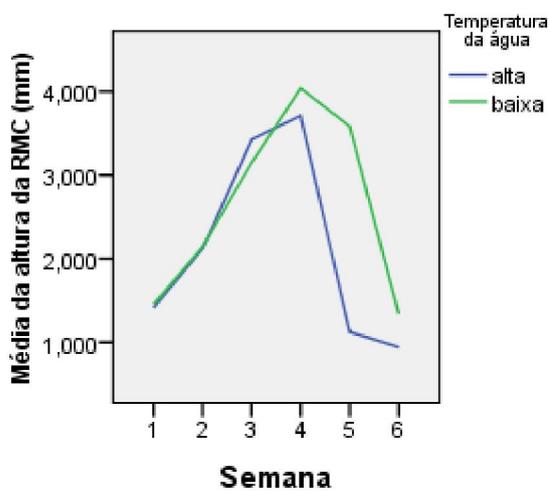
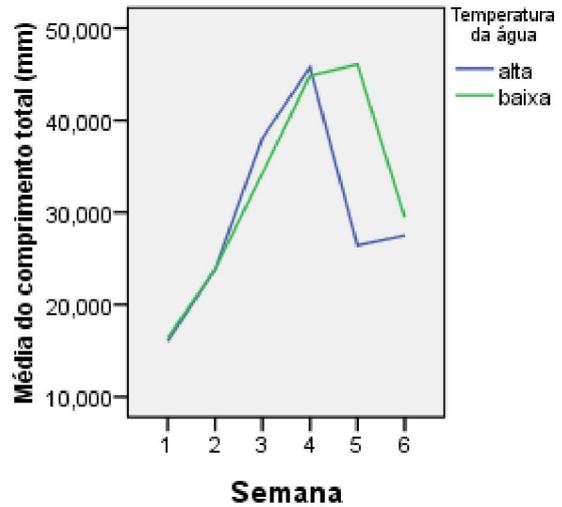
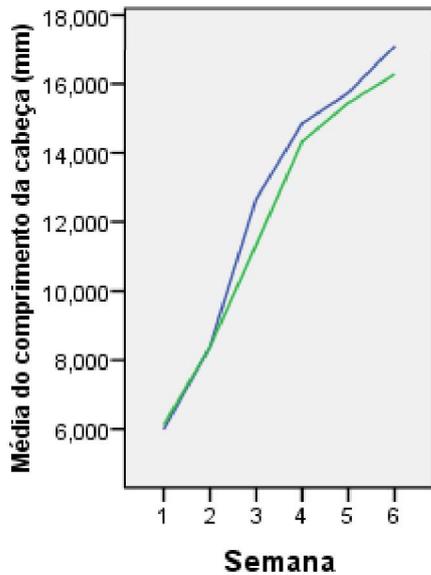
	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	180	11,965	19,923	15,55696	1,390471	,628	,181	1,025	,360
Comprimento total	180	14,175	55,383	38,86427	14,312227	-,744	,181	-1,154	,360
Altura da RMC	180	,000	4,807	2,68322	1,815821	-,584	,181	-1,385	,360
Altura da MC	180	,000	8,831	4,84618	3,323890	-,525	,181	-1,414	,360
Largura da RMC	180	,000	5,011	3,36072	1,027122	-,899	,181	-,155	,360
Distância inter-orbital	180	4,852	7,124	5,94001	,528819	,036	,181	-,943	,360
Volume	180	,40	1,10	,7281	,20161	-,023	,181	-1,345	,360

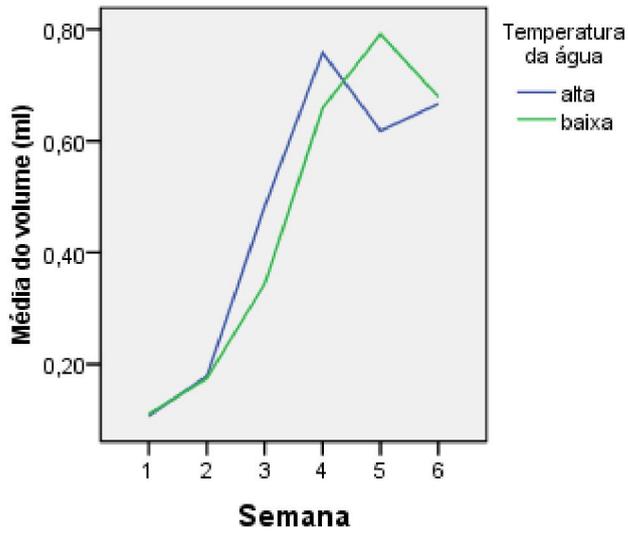
6ª semana

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Assimetria		Achatamento	
	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Estatística	Erro Padrão	Estatística	Erro Padrão
Comprimento da cabeça	85	14,147	20,029	16,33272	1,142395	,577	,261	,979	,517
Comprimento total	85	14,929	57,209	29,34589	15,455379	,648	,261	-1,395	,517
Altura da RMC	85	,000	4,907	1,31136	1,765657	,850	,261	-,992	,517
Altura da MC	85	,000	9,424	2,35318	3,188429	,885	,261	-,894	,517
Largura da RMC	85	,692	4,931	2,63744	1,057624	,420	,261	-1,160	,517
Distância inter-orbital	85	5,078	7,832	5,75696	,476801	1,581	,261	3,507	,517
Volume	85	,40	1,10	,6782	,20880	,660	,261	-,949	,517

Anexo V

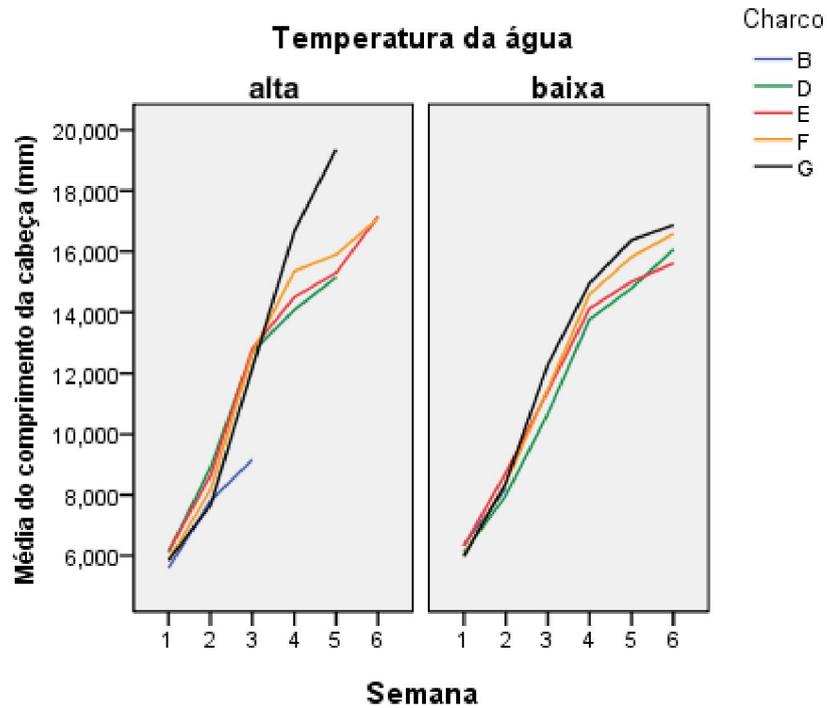
Gráficos das variáveis ao longo das seis semanas de experiências no laboratório para as duas temperaturas

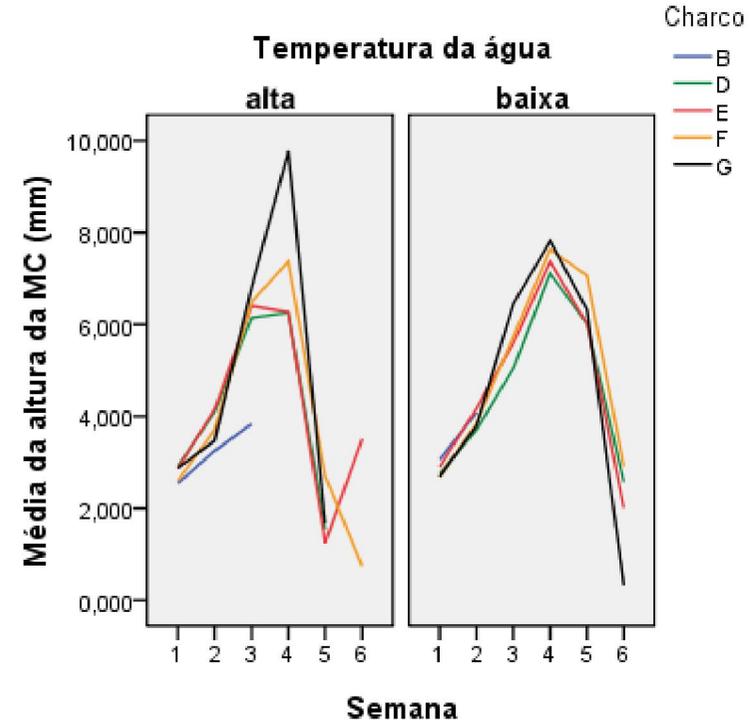
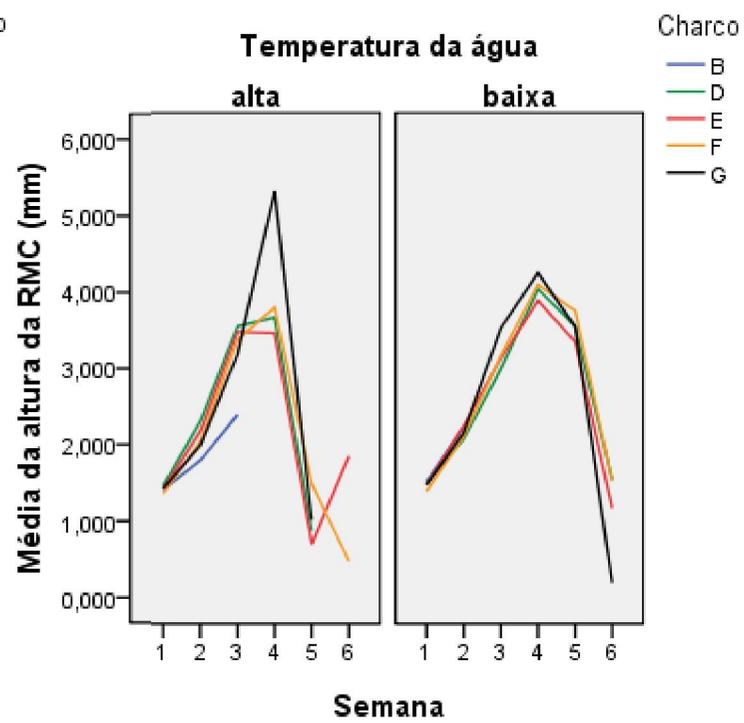
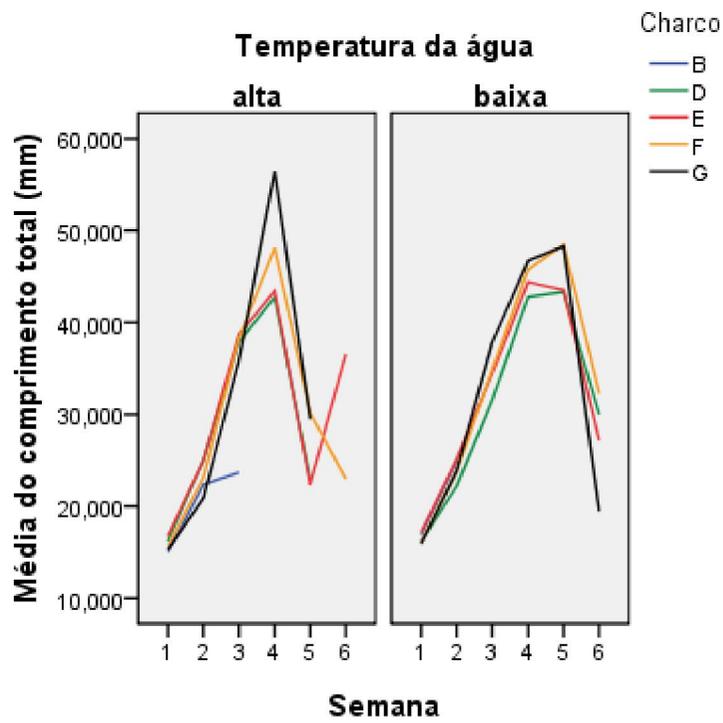


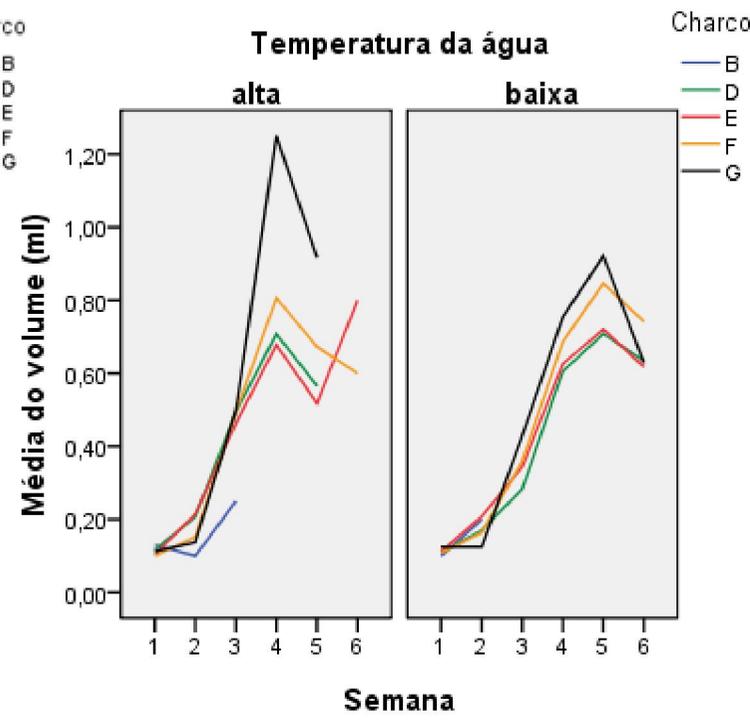
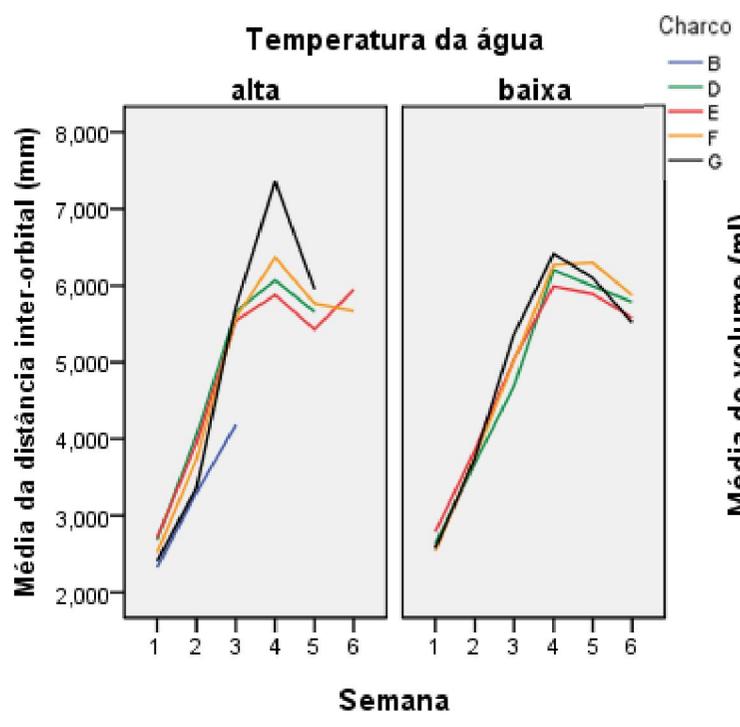
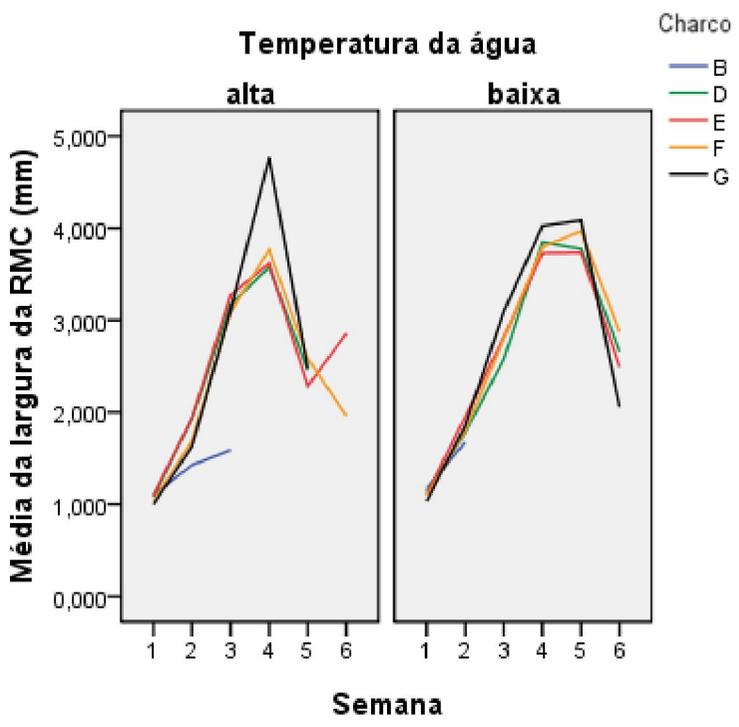


Anexo VI

Gráficos das variáveis ao longo das seis semanas de experiências no laboratório para os charcos nas duas temperaturas







Anexo VII

Valores significativos (sig – valores de $p < 0,05$) obtidos pela ANOVA (P – teste paramétrico) e pelo teste Kruskal-Wallis (NP – teste não-paramétrico) com os quais se observaram diferenças no crescimento dos girinos nos vários estádios entre as duas temperaturas **(a)** e entre os charcos em cada temperatura **(b)**.

a)

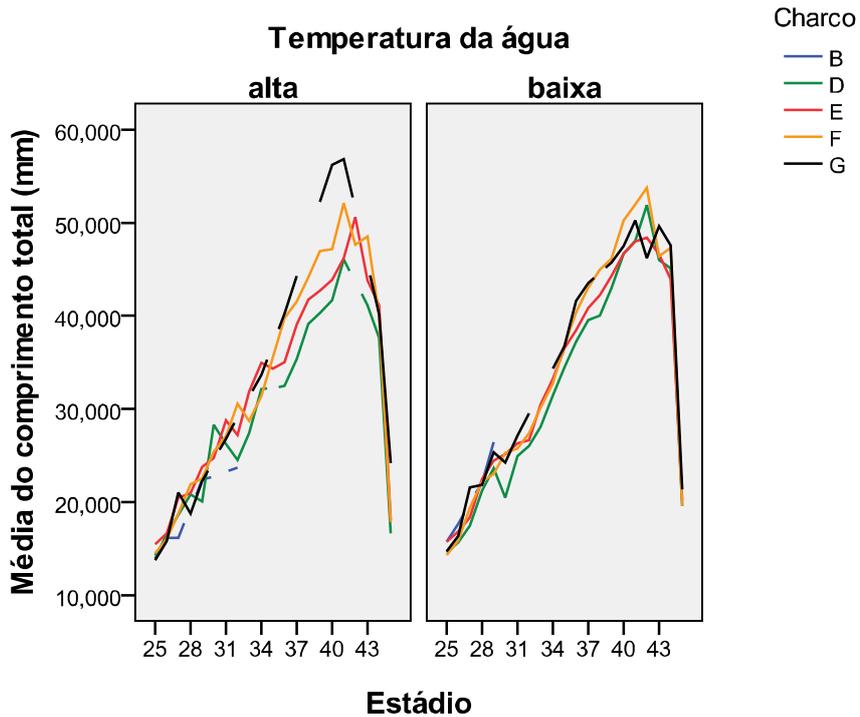
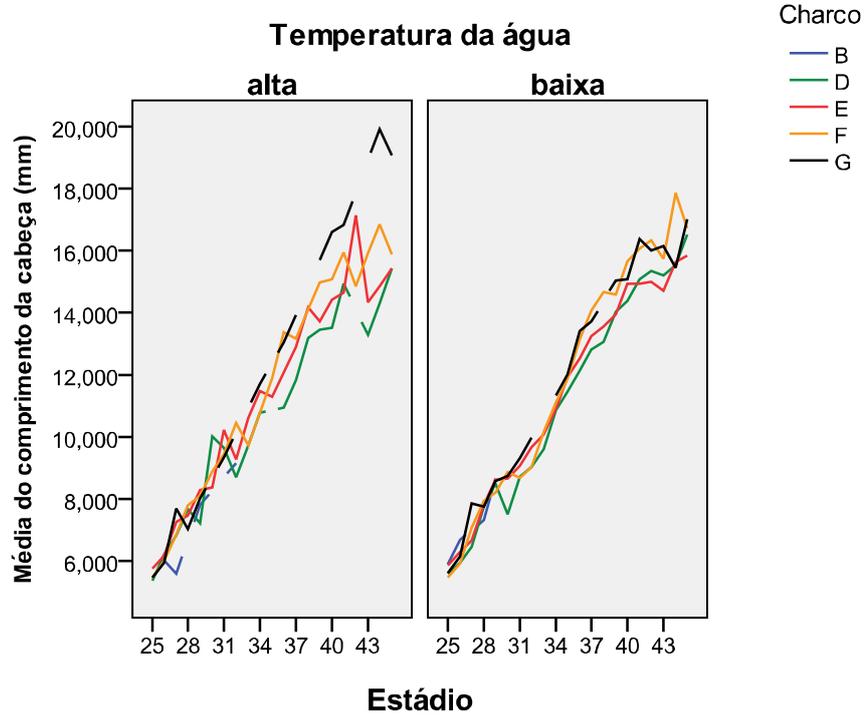
	Método	27	28	31	36	37	40	41	42	43	44	45
Comprimento da cabeça	P	-	sig	-	-	sig	-	-	-	-	-	-
	NP	-	-	sig	-	sig	-	-	-	-	-	sig
Comprimento total	P	-	sig	-	sig	sig	-	-	-	-	sig	-
	NP	-	sig	-	-	sig	sig	-	-	-	sig	sig
Altura da RMC	P	-	-	-	sig	-	-	-	-	-	-	-
	NP	sig	-	-	sig	sig	-	sig	sig	sig	-	-
Altura da MC	P	-	-	-	-	sig	-	-	-	-	-	-
	NP	-	-	-	-	sig	-	-	-	-	-	-
Largura da RMC	P	-	sig	-	-	sig	-	-	-	-	-	-
	NP	-	sig	-	-	sig	sig	sig	-	-	-	-
Distância inter-orbital	P	-	-	-	-	sig	-	-	-	-	-	-
	NP	-	-	-	-	sig	-	-	-	-	-	-

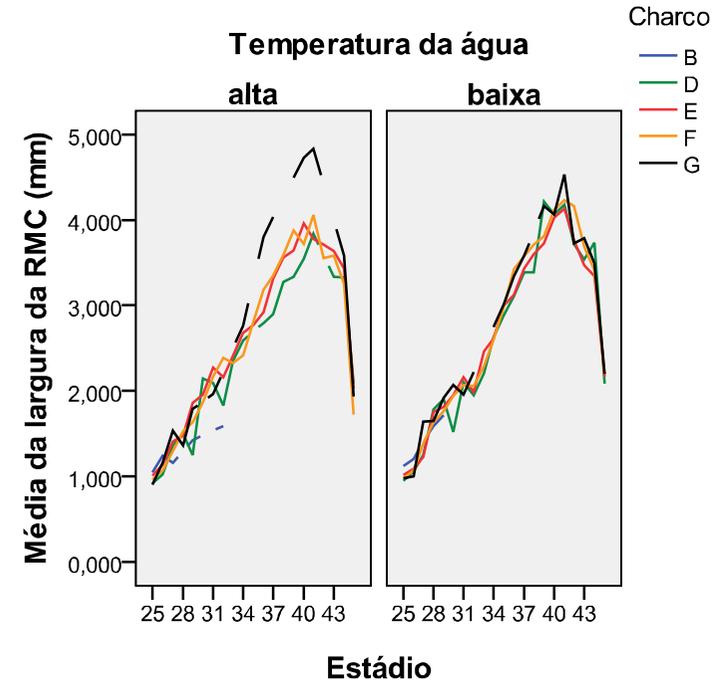
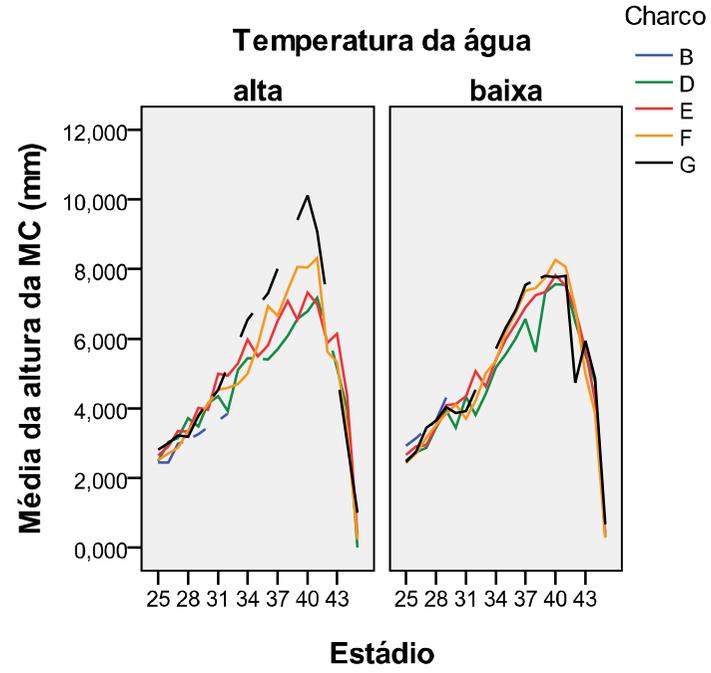
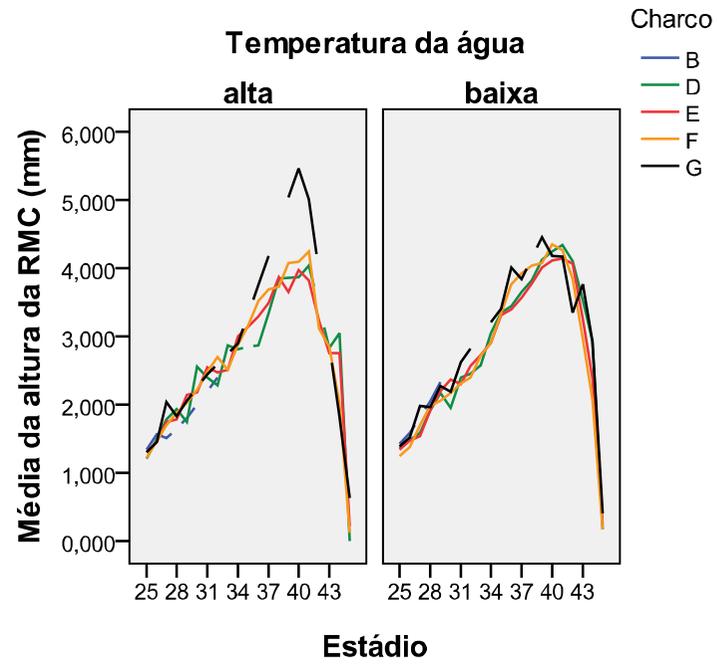
b)

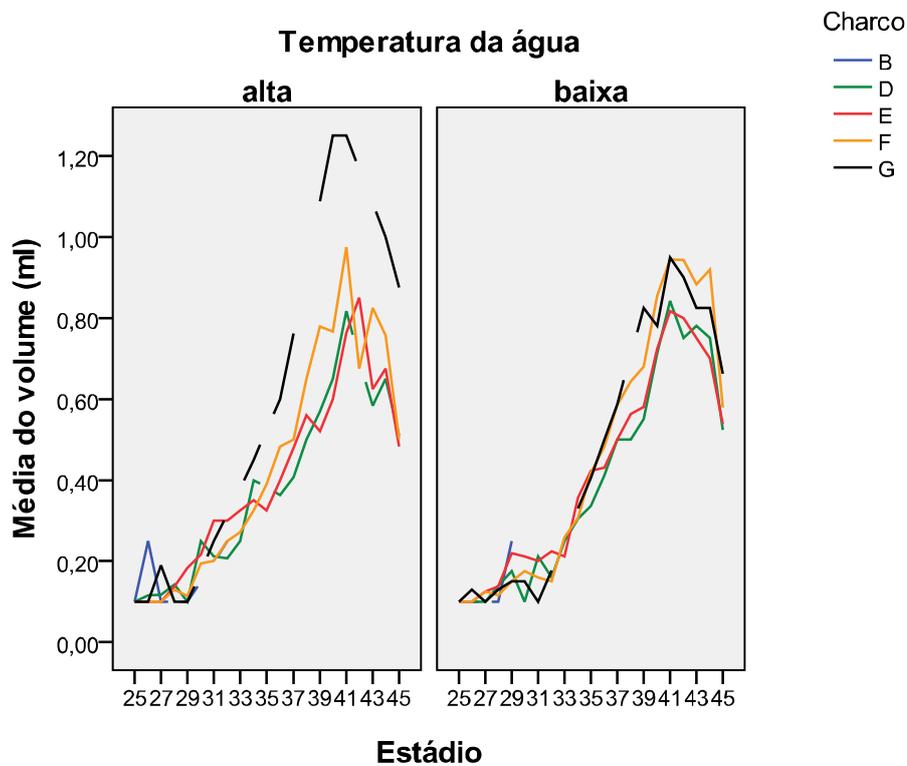
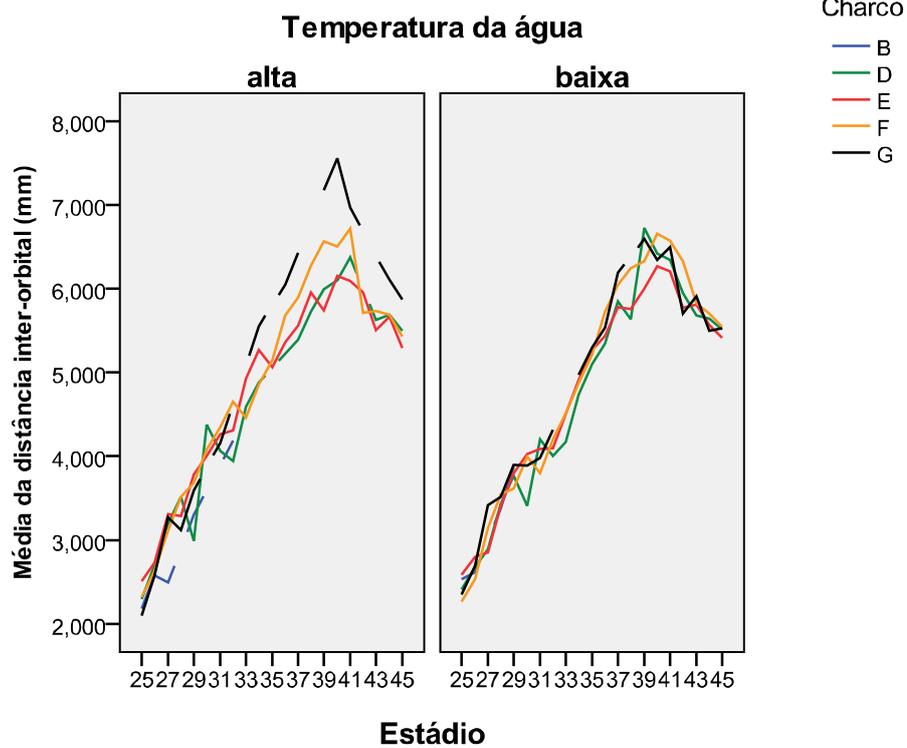
		Método	27	36	37	39	40	41	42	45
Temperatura alta	Comprimento da cabeça	P	-	-	-	-	-	-	-	-
		NP	-	sig	sig	-	sig	sig	-	-
	Comprimento total	P	-	-	-	-	sig	sig	-	-
		NP	-	sig	sig	sig	sig	sig	-	-
	Altura da RMC	P	-	-	-	-	sig	sig	-	-
		NP	-	-	sig	-	-	sig	-	-
	Altura da MC	P	-	-	-	-	sig	sig	-	-
		NP	-	sig	sig	sig	sig	sig	-	-
	Largura da RMC	P	-	-	-	-	sig	-	-	-
		NP	-	sig	sig	-	-	sig	-	-
	Distância inter-orbital	P	-	-	-	-	sig	-	-	-
		NP	-	sig	-	sig	sig	sig	-	sig
Temperatura baixa	Comprimento da cabeça	P	-	-	-	-	-	-	-	sig
		NP	sig	sig	-	sig	-	-	sig	sig
	Comprimento total	P	-	-	-	-	-	-	-	-
		NP	sig	-	-	sig	-	-	sig	-
	Altura da RMC	P	-	-	-	-	-	-	-	-
		NP	-	sig	-	-	-	-	-	-
	Altura da MC	P	-	-	-	-	-	-	-	-
		NP	-	-	-	-	-	-	sig	-
	Largura da RMC	P	-	-	-	-	-	-	-	-
		NP	-	sig	-	-	-	-	sig	-
	Distância inter-orbital	P	-	-	-	-	-	-	-	-
		NP	sig	-	-	sig	-	-	sig	-

Anexo VIII

Gráficos com as curvas de crescimento dos girinos ao longo dos estádios segundo os charcos para cada temperatura







Anexo IX

Quadro descritivo das regressões lineares para o tamanho da cabeça (réplicas com C correspondem aos dados de campo)

Charco	Réplica	Temperatura	Coefficiente de Pearson	Significância da correlação	R ²	Constante	Coefficiente da regressão
A	AC	-	0,903	0,000	0,816	-16,982	0,929
B	B	alta	0,945	0,001	0,892	-8,14	0,539
B	B	baixa	0,964	0,000	0,930	-10,072	0,640
B	BC	-	0,904	0,000	0,817	-5,072	0,524
C	CC	-	0,903	0,000	0,816	-3,199	0,463
D	média	alta	0,963	0,000	0,928	-7,017	0,510
D	média	baixa	0,975	0,000	0,950	-8,660	0,570
D	D1	alta	0,983	0,000	0,966	-7,359	0,521
D	D1	baixa	0,987	0,000	0,974	-8,824	0,578
D	D2	alta	0,930	0,000	0,866	-6,550	0,504
D	D2	baixa	0,954	0,000	0,910	-7,314	0,523
D	D3	alta	0,948	0,000	0,900	-6,280	0,487
D	D3	baixa	0,979	0,000	0,959	-10,170	0,620
D	D4	alta	0,956	0,001	0,913	-8,661	0,547
D	D4	baixa	0,990	0,000	0,980	-10,652	0,616
D	D5	alta	0,967	0,000	0,935	-6,691	0,503
D	D5	baixa	0,969	0,000	0,939	-5,305	0,471
D	DC	-	0,894	0,000	0,798	-1,056	0,385
E	média	alta	0,960	0,000	0,921	-6,779	0,515
E	média	baixa	0,963	0,000	0,928	-7,314	0,536
E	E1	alta	0,974	0,000	0,948	-8,893	0,581
E	E1	baixa	0,978	0,000	0,957	-8,432	0,575
E	E2	alta	0,956	0,000	0,914	-6,464	0,498
E	E2	baixa	0,972	0,000	0,945	-7,283	0,531
E	E3	alta	0,949	0,000	0,901	-5,034	0,481
E	E3	baixa	0,941	0,000	0,885	-6,076	0,492
E	E4	alta	0,971	0,000	0,942	-6,664	0,509
E	E4	baixa	0,964	0,000	0,930	-7,762	0,555
E	EC	-	0,818	0,000	0,669	-4,391	0,500
F	média	alta	0,968	0,000	0,937	-8,752	0,581
F	média	baixa	0,975	0,000	0,950	-9,698	0,617
F	F1	alta	0,973	0,000	0,947	-7,744	0,550
F	F1	baixa	0,981	0,000	0,963	-9,232	0,601
F	F2	alta	0,988	0,000	0,976	-10,788	0,652
F	F2	baixa	0,972	0,000	0,945	-9,767	0,628
F	F3	alta	0,974	0,000	0,948	-9,751	0,609
F	F3	baixa	0,981	0,000	0,962	-10,371	0,632
F	F4	alta	0,940	0,000	0,883	-5,417	0,495
F	F4	baixa	0,957	0,000	0,916	-8,866	0,594
F	F5	alta	0,963	0,000	0,928	-9,155	0,590
F	F5	baixa	0,973	0,000	0,947	-9,673	0,616
F	FC	-	0,847	0,000	0,717	-12,011	0,789
G	média	alta	0,986	0,000	0,972	-12,358	0,712
G	média	baixa	0,980	0,000	0,961	-8,724	0,590
G	G1	alta	0,864	0,000	0,747	-7,926	0,555
G	G1	baixa	0,978	0,000	0,956	-8,593	0,585
G	G2	alta	0,988	0,000	0,975	-12,889	0,725
G	G2	baixa	0,982	0,000	0,964	-8,836	0,594
H	HC	-	0,882	0,000	0,778	-11,933	0,783