

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Efeitos de uma onda de calor no crescimento e no desenvolvimento de girinos da rã-de-focinho-pontiagudo, *Discoglossus galganoi* : é possível compensá-los com diferentes dietas?

Vanessa Duarte Rosa da Costa Pinto

Dissertação

Mestrado em Biologia da Conservação

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Efeitos de uma onda de calor no crescimento e no desenvolvimento de girinos da rã-de-focinho-pontiagudo, *Discoglossus galganoi* : é possível compensá-los com diferentes dietas?

Vanessa Duarte Rosa da Costa Pinto

Dissertação

Mestrado em Biologia da Conservação

Orientado por Professor Doutor Rui Rebelo

2014

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida no âmbito do Projeto “Does temperature affect diet choice by aquatic ectotherms?” (Projeto EXPL_BIA-ANM_0932_2012), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC (PIDDAC) no âmbito do Programa Exploratórios 2012.

As posturas de *Discoglossus galganoi* utilizadas neste projecto foram colhidas com a autorização do ICNF (Licença nº 211/2014/CAPT).

À minha família,
Pelo apoio e incentivo,
Pelos valores humanos transmitidos,
Pela confiança depositada.

Agradecimentos

Ao fim de 5 anos de estudo e dedicação termina mais uma fase importante na vida de qualquer estudante. Terminamos esta etapa com a convicção de que as bases estão criadas mas ainda existe um longo caminho a percorrer em termos de estudo.

Gostaria de deixar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me acompanharam durante estes anos e que, de alguma forma, contribuíram para tornar este trabalho uma realidade.

- Ao meu excelente orientador Prof. Doutor Rui Rebelo por todo o apoio, pela sua dedicação e disponibilidade a qualquer hora, pela partilha de conhecimentos e por todo o cuidado com que se dedicou a cada pormenor.

- Ao Bruno Carreira por toda a paciência e tempo disponibilizado a tirar as minhas dúvidas e pela partilha de conhecimentos que foram fundamentais.

- A todas as pessoas que me ajudaram em tarefas fantásticas como mudar águas, alimentar girinos e cortar esferovites: Andreia Penas, Daniel Mameri, Diogo Antunes, Ana Laura Carreiras, Miguel Lopes. Se me esqueci de alguém por favor perdoem-me.

- Ao Anxo e à Vânia Baptista pela companhia no Biotério e no Laboratório. O tempo passou mais rápido graças a vocês.

- A todos os meus amigos pela companhia ao longo deste ano e pelas fabulosas horas de almoço, a única altura para apanhar ar e socializar durante os meses em que a minha companhia foi, maioritariamente, pequenos animais nadantes e saltitantes.

- Ao Afonso Henriques por todo o apoio, incentivo, dedicação e por me ter ajudado sempre que precisei.

- Ao Nuno Gonçalves e ao Ricardo Rodrigues por todas as horas que disponibilizaram do seu precioso tempo no Biotério a ajudar-me em todas as tarefas rotineiras. Sem vocês toda esta experiência não teria sido a mesma.

- À minha irmã Patrícia por se ter disponibilizado a ajudar-me e a facilitar a “luta contra o tempo”.

- Aos meus pais por nunca terem interferido nas minhas escolhas e por todo o apoio que me deram.

Índice

Agradecimentos	4
Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Metodologia	14
A espécie estudada	14
Área de estudo	14
Colheita das posturas	15
Procedimento experimental.....	15
Desenho experimental	16
Monitorização de parâmetros morfológicos, de desenvolvimento e comportamentais.....	18
Tratamento estatístico	19
Resultados	20
Comportamento.....	20
Comprimento da cabeça	21
Estádio de desenvolvimento	22
Mortalidade	23
Período larvar.....	24
Comprimento do corpo	25
Comprimento da tíbia	26
Peso.....	27
Capacidade de fuga	28
Resistência	29
Discussão	30
Efeitos da temperatura	30
Efeitos da Dieta	32
Interacções entre temperatura e dieta	33
Efeitos da onda de calor	35
Considerações finais	37
Referências bibliográficas	39

Resumo

Nas últimas décadas tem-se verificado o desaparecimento de muitas espécies de anfíbios a um ritmo elevado. As condições ambientais têm especial importância por influenciarem o crescimento e a sobrevivência destes animais. Os modelos relativos às alterações climáticas prevêem que o aumento da temperatura global esteja associado ao aumento de eventos extremos como ondas de calor. Os impactos na dinâmica dos corpos de água pouco profundos podem ser severos, podendo provocar a subida da temperatura da água para valores para os quais as comunidades não estão adaptadas. Este estudo tem como objectivos avaliar os efeitos de uma onda de calor e os efeitos da interacção entre a temperatura e a dieta no crescimento e no desenvolvimento nos girinos e nas características dos pós-metamórficos da rã-de-focinho-pontiagudo, *Discoglossus galganoi*. São testados 4 tratamentos térmicos: frio, quente, aquecimento gradual e um que replica os efeitos de uma onda de calor, e 3 dietas: uma rica em proteínas, outra pobre em proteínas e uma terceira, que possibilita a escolha entre as duas dietas. Observou-se que temperaturas frias prolongam o período larvar e aumentam o tamanho à metamorfose e temperaturas quentes aceleram o desenvolvimento à custa de um tamanho menor. A dieta rica em proteínas acelerou o crescimento e o desenvolvimento e a dieta pobre em proteínas provocou elevada mortalidade em temperaturas quentes. A onda de calor teve efeitos negativos sobre os girinos que puderam escolher a sua dieta, efeitos esses quase totalmente compensados nos animais com uma dieta rica em proteínas. Este estudo mostrou que as condições do meio podem ser desfavoráveis em charcos onde os girinos dependam apenas de plantas para se alimentarem, principalmente se a temperatura aumentar. Mostrou também que não é vantajoso atrasar a época de reprodução pois os girinos podem ficar expostos a ondas de calor. Nesta situação uma dieta animal é crucial para um rápido crescimento e uma metamorfose com sucesso; contudo a presença de macroinvertebrados em habitats efémeros pode ser reduzida. Observou-se que os girinos não optaram por ingerir uma dieta com maior qualidade, sugerindo que esta espécie não está adaptada às consequências de alterações repentinas da temperatura, nomeadamente, ondas de calor.

Palavras-chave: Dieta, *Discoglossus galganoi*, Metamorfose, Temperatura, Onda de calor

Abstract

Amphibians are disappearing at an alarming rate in the last decades. Environmental conditions are particularly important in this group of animals, influencing growth and survival. Current models of climate change predict that the increase in global temperature will be associated with an increase in frequency, intensity and duration of heat waves. Their impacts on the dynamics of shallow bodies of water can be severe and may rise water temperatures to values for which the individuals are not adapted. This study assesses the effects of a heat wave as well as the combined effects of temperature and diet on growth and development of Iberian- Painted-Frog, *Discoglossus galganoi*, tadpoles. Four temperature treatments: cold, warm, gradual temperature rise and a heat wave and three diets: protein-rich, protein-poor and both types presented together, allowing the choice between the two diets, were tested. Cold temperatures extended the larval period and increased size at metamorphosis, while warm temperatures accelerated the development at the cost of a smaller size. The protein-rich diet accelerated growth and development, while the protein-poor diet caused high mortality in warm temperatures. The heat wave had detrimental effects on the tadpoles that could choose from among both diets; these effects were much weaker in the tadpoles that were fed a protein-rich diet. This study showed that environmental conditions may be disadvantageous in ponds where tadpoles depend mainly on plant-based diets, especially in the presence of increased temperatures, a protein-rich diet could mitigate these effects, but the abundance of macroinvertebrates in ephemeral habitats may be low. This study also showed that it is not advantageous to delay the breeding season because tadpoles can be exposed to possible heat waves occurring in early spring. In order to overcome the effect of heat waves, tadpoles could theoretically increase the intake of protein-rich items. However, in our experiment, they did not take that option, which is an indication that this species is not adapted to the consequences of increasing temperatures.

Key-words: Diet, *Discoglossus galganoi*, Heat wave, Metamorphosis, Temperature

Introdução

Os anfíbios constituem uma parte significativa da biomassa de vertebrados em ecossistemas florestais e em zonas húmidas, sendo fundamentais para o funcionamento destes ecossistemas devido ao seu papel como predadores e de presas (Burton e Likens, 1975; Gibbons *et al.*, 2006). Entre as ameaças principais a este grupo estão a fragmentação dos habitats, a poluição, as epidemias/doenças infecciosas, as espécies invasoras e as alterações climáticas (Carey e Alexander, 2003). Como consequência destas ameaças, isoladas e em grupo, nas últimas décadas tem-se verificado o desaparecimento de muitas espécies de anfíbios a um ritmo acelerado (Stuart *et al.*, 2004).

As condições ambientais têm especial importância para os anfíbios por influenciarem muito significativamente o seu crescimento e a sua sobrevivência (Scott *et al.*, 2007). A existência e a duração dos corpos de água são características do habitat determinantes para a reprodução dos anfíbios (Hamer e McDonnell, 2008). O hidroperíodo - período de tempo durante o qual as massas de água contêm água - influencia fortemente a estrutura e a composição das comunidades de anfíbios (Wellborn *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 2007), e pensa-se que seja determinante na distribuição de muitas espécies (Rubbo e Kiesecker, 2005). O regime de precipitação influencia a duração dos habitats aquáticos (Bonada e Resh, 2013) e, conseqüentemente, a duração destes habitats (Rowe e Dunson, 1995). Outro factor que condiciona a distribuição e diversidade dos anfíbios a nível global é a temperatura, uma vez que os anfíbios são ectotérmicos, ou seja, não possuem mecanismos de termorregulação eficientes, tirando partido do ambiente exterior para obter calor (Atkinson e Sibly, 1997; Vitt e Caldwell, 2009).

Os modelos relativos às alterações climáticas prevêem que o aumento da temperatura global esteja associado ao aumento da frequência, intensidade e duração de eventos climáticos extremos (Easterling *et al.*, 2000; Meehl e Tebaldi, 2004), como ondas de calor e períodos de seca (Easterling *et al.*, 2000; Jentsch *et al.*, 2007). Algumas regiões, como a bacia mediterrânica, serão mais frequentemente sujeitas a ondas de calor (período de temperaturas anormalmente elevadas) (Meehl e Tebaldi, 2004). O impacto destes eventos extremos na dinâmica dos corpos de água pouco profundos pode ser elevado (Dokulil *et al.*, 2010), resultando na subida da temperatura da água para valores para os quais as comunidades não estão adaptadas, ou mesmo no desaparecimento precoce destes corpos de água.

O ciclo de vida de praticamente todos os anfíbios inclui um estado larvar aquático e um estado adulto aquático e/ou terrestre (Wilbur, 1980). A transição entre estas duas formas ecológica e ecologicamente diferentes ocorre durante a metamorfose (Pandian e Marian, 1985b), um

processo que envolve uma série de transformações fenotípicas num curto espaço de tempo. Durante a metamorfose, órgãos, membros e tecidos são reorganizados, resultando em alterações morfológicas e fisiológicas que permitem aos anfíbios passar de um ambiente aquático para um ambiente terrestre (Castañeda *et al.*, 2006). Factores ambientais como a temperatura e a dieta podem influenciar a metamorfose, uma vez que afectam directamente a produção e/ou a sensibilidade dos tecidos à tiroxina – a hormona que controla a metamorfose, promovendo a proliferação e a diferenciação das células e inibindo o crescimento (Denver, 1997; Kollros, 1961; Kupferberg, 1997; White e Nicoll, 1981).

Os animais com ciclos de vida complexos enfrentam períodos críticos para a sobrevivência antes e durante a transição entre as formas de larva e de adulto (Arnold e Wassersug, 1978). A dessecação dos charcos temporários e a predação são importantes causas de mortalidade das formas larvares de anfíbios (Calef, 1973). Este risco de mortalidade aumenta em função do tempo despendido nos charcos, resultando num *trade-off* entre a sobrevivência pré – e pós-metamórfica. Ao entrarem num novo habitat, a vulnerabilidade dos recém-metamorfoseados é elevada devido à reduzida capacidade de locomoção (Arnold e Wassersug, 1978; Wassersug e Sperry, 1997). Por outro lado, há também uma perda de condição corporal, uma vez que, no caso das formas larvares de anuros, os indivíduos não se alimentam durante a metamorfose, devido à transformação de um sistema digestivo adaptado a dieta vegetal e/ou animal num sistema digestivo adaptado a uma dieta apenas de origem animal (Downie *et al.*, 2004). O tamanho do recém-metamorfoseado pode também ter consequências importantes para a sua vida futura (Altwegg e Reyer, 2003; Álvarez e Nicieza, 2002a; Blouin e Brown, 2000; Semlitsch *et al.*, 1988; Smith, 1987), pois este parâmetro, assim como o peso, influenciam a sua sobrevivência. Por exemplo, corpos pequenos aumentam a vulnerabilidade - os indivíduos ficam mais susceptíveis à dessecação, predação, competição, infecções, escassez de alimento (Janzen, 1993). Assim, este parâmetro é determinante na sobrevivência e no sucesso reprodutor do futuro adulto (Altwegg e Reyer, 2003). Desta forma, é vantajoso que as formas larvares atinjam um estado limiar definido por um conjunto de condições ecológicas e fisiológicas (tamanho corporal, reservas lipídicas, capacidades locomotoras mínimas) no fim da metamorfose, para reduzir potenciais riscos (Álvarez e Nicieza, 2002a).

Os girinos (formas larvares dos anfíbios anuros) podem ser consumidores importantes nos diversos habitats aquáticos onde são encontrados (Whiles *et al.*, 2006). Durante décadas pensou-se que os girinos eram maioritariamente herbívoros. Esta dedução foi principalmente devida à observação de conteúdos estomacais, os quais exibiam normalmente material

vegetal; ao comprimento (longo) do seu intestino; e ao sucesso em criar girinos com uma dieta vegetal (Alford, 1999; Wassersug e Hoff, 1979). No entanto, nenhum desses estudos quantificou o que de facto terá sido assimilado pelos girinos (Evans-White *et al.*, 2003). Observações mais recentes de oofagia, carnivorina e necofagia sugerem que a maioria das espécies estudadas apresenta uma dieta omnívora (Altig *et al.*, 2007; Petranka e Kennedy, 1999; Schiesari *et al.*, 2009), havendo tendência em alguns casos para o canibalismo (Crump, 1990). A plasticidade do comprimento do trato digestivo dos girinos pode indicar uma considerável variabilidade intra-específica ao nível da dieta (Horiuchi e Koshida, 1989), e, possivelmente, a existência de preferências alimentares (Kupferberg *et al.*, 1994).

A qualidade do alimento determina a quantidade que é necessário ingerir para atingir uma determinada taxa de crescimento e, portanto, afecta o tempo despendido no forrageio necessário para chegar ao tamanho crítico para a metamorfose (Álvarez e Nicieza, 2002a), o qual pode ser limitado pelo hioperíodo dos corpos de água (Nicieza *et al.*, 2006). Alguns estudos sugerem que dietas ricas em proteínas podem acelerar as taxas de crescimento e de desenvolvimento (Nathan e James, 1972; Pandian e Marian, 1985a; Steinwascher e Travis, 1983), por actuarem sobre a tiróide (Kupferberg, 1997). Num estudo realizado com duas espécies, *Rana clamitans* e *Hyla chrysoscelis*, observou-se que a quantidade de alimento influenciou o crescimento de *R. clamitans*, independentemente do rácio entre proteínas-carboidratos; contudo, nem a quantidade nem a qualidade do alimento tiveram qualquer efeito no seu desenvolvimento (Steinwascher e Travis, 1983). Em *H. chrysoscelis* o crescimento foi mais rápido com uma dieta com maior rácio entre proteínas e carboidratos, que também acelerou o desenvolvimento. Este resultado sugere que a dieta óptima para as duas espécies pode ser diferente (Steinwascher e Travis, 1983). Num outro estudo observou-se que girinos de *Discoglossus galganoi* sujeitos a uma alimentação rica em proteínas metamorfosearam-se primeiro que os girinos com uma alimentação pobre em proteínas (Nicieza *et al.*, 2006). Assim, de um modo geral a dieta (na forma de quantidade e/ou qualidade) influencia o crescimento, mas o seu efeito no desenvolvimento é mais variável.

A temperatura é um dos factores ambientais com maior impacto no crescimento e no desenvolvimento em ectotérmicos (Blouin e Brown, 2000; Orizaola e Laurila, 2009b; Pandian e Marian, 1985b; Van der Have e Jong, 1996). A temperatura afecta essencialmente a taxa de desenvolvimento dos girinos, enquanto a dieta afecta principalmente o seu crescimento (Smith-Gill e Berven, 1979; Tejedo *et al.*, 2010). Quando as temperaturas do meio são baixas, a sensibilidade dos tecidos dos girinos à tiroxina diminui e os seus efeitos no desencadear da metamorfose são inibidos (Kollros, 1961). Assim, temperaturas frias estendem o período larvar

e aumentam o tamanho à metamorfose. Inversamente, temperaturas quentes aceleram o desenvolvimento à custa de um tamanho menor (Álvarez e Nicieza, 2002a; Angilletta *et al.*, 2004; Atkinson e Sibly, 1997; Blouin e Brown, 2000; Pandian e Marian, 1985b; Van Der Have e Jong, 1996). Como consequência desta plasticidade térmica, alterações da temperatura da água durante o período larvar podem modificar a sua duração, o processo de metamorfose, e afectar a fisiologia, o desenvolvimento e a morfologia dos estádios mais avançados (Downie *et al.*, 2004; Nicieza *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2008a, 2008b). Esta plasticidade térmica exibida pelo tamanho corporal é designada como “the temperature-size rule” (Angilletta *et al.*, 2004).

Wilbur e Collins (1973) propuseram um modelo, baseado na taxa de crescimento, onde prevêem quando e a que tamanho a metamorfose deve ocorrer. Neste modelo, a metamorfose deve ocorrer dentro de um determinado intervalo de tamanhos, sendo os limites superior e inferior provavelmente determinados evolutivamente. O limite inferior pode ser imposto pela sobrevivência do juvenil com menor tamanho e o limite superior pode ser imposto pela duração do período larvar, a qual depende das condições do habitat (disponibilidade de alimento, duração da fase alagada, etc.). Por exemplo, se as condições do meio (recursos tróficos abundantes) permitirem um rápido crescimento é provável que os girinos adiem a metamorfose para tirarem partido da oportunidade de entrar no meio terrestre com tamanhos maiores. Por outro lado, se as condições do meio não permitirem um rápido crescimento, o efeito da falta de recursos sobre o período larvar irá depender da altura em que a redução desses recursos ocorreu. Assim, quando o habitat não é adequado, a metamorfose vai ocorrer a partir do momento em que os girinos alcançam o tamanho crítico; por outro lado, se a escassez de alimento ocorrer no final do desenvolvimento, irá haver uma redução do período larvar. Num estudo realizado com *Rana temporaria* observou-se que os girinos sujeitos a períodos de escassez de alimento metamorfosearam-se mais cedo que os girinos não sujeitos a escassez de alimento (Nicieza, 2000). Hensley (1993) realizou um estudo com o objectivo de esclarecer se as taxas de desenvolvimento são fixas. Neste exemplo com relas *Pseudacris crucifer* a dieta influenciou o tempo e o tamanho à metamorfose e o desenvolvimento foi retardado entre os estádios Gosner (1960) 35-37; a partir desse momento, independentemente de alterações no nível do alimento, a idade à metamorfose não variou. É possível observar que existem resultados que suportam e outros que refutam os modelos propostos, mas uma coisa é certa: existem mecanismos que regulam o crescimento e o desenvolvimento e estes são altamente sensíveis às condições ambientais (Rose, 2005).

A possibilidade de redução do período larvar em espécies que se reproduzem em habitats efémeros pode conduzir a um aumento da *fitness* (Álvarez e Nicieza, 2002a). O

aumento da temperatura da água pode acelerar a taxa de desenvolvimento dos girinos, aumentando as suas hipóteses de sobrevivência por diminuir a duração do período larvar. No entanto, esta redução pode resultar em menores tamanhos pós-metamórficos (Abrams *et al.*, 1996) e num conseqüente decréscimo da sobrevivência dos juvenis (Blouin e Brown, 2000). Retardar a metamorfose pode ser adaptativo se resultar numa maior fecundidade ou aumentar a sobrevivência do adulto (Atkinson e Sibly, 1997; Stearns, 1992). A morfologia e a capacidade locomotora dos juvenis podem assim variar entre indivíduos que foram expostos a diferentes temperaturas durante o período larvar (Orizaola e Laurila, 2009a). Num estudo realizado com *Discoglossus galganoi* mostrou-se que as condições do meio (temperatura e dieta) durante o período larvar tiveram efeitos na performance locomotora por influenciarem o tamanho corporal. Neste exemplo, observou-se que os tratamentos com temperaturas elevadas e dieta pobre em proteínas deram origem a recém-metamorfoseados mais pequenos que, por sua vez, saltaram distâncias menores quando comparados com os recém-metamorfoseados maiores provenientes dos tratamentos com temperaturas moderadas ou dieta rica em proteínas (Álvarez e Nicieza, 2002b).

Para além de afectar o tamanho corporal dos girinos e dos recém-metamorfoseados, o meio ambiente pode influenciar o crescimento diferencial do corpo, dos membros posteriores e da cabeça durante o desenvolvimento dos girinos (Emerson, 1986). A variação na forma corporal pode reflectir-se no tamanho, na morfologia e na quantidade de reservas de energia dos recém-metamorfoseados (Álvarez e Nicieza, 2002b; Blouin e Brown, 2000), afectando a *performance* locomotora, o crescimento e sobrevivência dos juvenis (Wassersug e Sperry, 1977). O maior tamanho corporal confere vantagens predatórias aos recém-metamorfoseados (taxas de ataque mais eficazes, consumo de presas maiores), e proporciona-lhes, ainda uma maior capacidade de salto (Cabrera-Guzmán *et al.*, 2013; John-Alder e Morin, 1990), importante para a aquisição de alimento (Walton, 1988) e para a fuga aos predadores (Wassersug e Sperry, 1977). Contudo, os custos de tamanhos larvares maiores ou de períodos larvares menores podem ser manifestados em morfologias sub-óptimas nos estádios pós-metamórficos e diminuir a *performance* locomotora (Álvarez e Nicieza, 2002b; Tejedo *et al.*, 2010).

Se o habitat for heterogéneo, permitindo o forrageio selectivo e a escolha de microhabitat de acordo com preferências térmicas, é possível que os girinos exibam algum controlo sobre o seu tamanho e idade à metamorfose, decisivos na sua *performance* no meio terrestre e na sua sobrevivência enquanto juvenis (Álvarez e Nicieza, 2002b). É assim teoricamente possível que os girinos exibam forrageio selectivo e respostas adaptativas à

variação da qualidade da dieta (Álvarez e Nicieza, 2002a; Kupferber *et al.*, 1994), da temperatura, ou de combinações de estes dois factores.

Esta tese tem como objectivos avaliar o efeito de uma onda de calor e os efeitos da interacção entre a temperatura e a dieta no crescimento e no desenvolvimento nos girinos da rã-de-focinho-pontiagudo, *Discoglossus galganoi* (Capula, Nascetti, Lanza, Bullini e Crespo 1985), assim como nas características dos pós-metamórficos. São testados 4 tratamentos térmicos, incluindo um tratamento que replica os efeitos de uma onda de calor, e 3 dietas: uma com origem animal (mais rica em proteínas), outra com origem vegetal (menos rica em proteínas), e uma terceira, na qual os indivíduos têm acesso às duas dietas.

Relativamente à onda de calor, espera-se que esta acelere o desenvolvimento dos girinos e que, devido ao menor período larvar resultante, estes apresentem tamanho menor à metamorfose e, conseqüentemente, tenham menor capacidade de salto. Espera-se que os girinos provenientes da dieta mista apresentem desenvolvimento mais extenso e maior tamanho que os girinos sujeitos à dieta animal. E, posteriormente, que apresentem tamanho à metamorfose, condição física e capacidade de salto maiores comparados com os as restantes dietas.

É expectável que os períodos larvares dos girinos sujeitos a temperaturas frias sejam prolongados e os tamanhos à metamorfose maiores. Inversamente, os girinos sujeitos a temperaturas quentes deverão apresentar períodos larvares curtos e tamanhos à metamorfose menores. A dieta rica em proteínas deverá influenciar positivamente o crescimento e desenvolvimento dos girinos, resultando em girinos e recém-metamorfoseados maiores e permitindo o desenvolvimento mais rápido, em comparação com a dieta à base de planta. Espera-se que a interacção de temperaturas elevadas com uma dieta pobre em proteínas resulte em períodos larvares curtos e girinos pequenos e, conseqüentemente, recém-metamorfoseados pequenos, com condição física reduzida e capacidade locomotora diminuta. Adicionalmente, espera-se que com temperaturas elevadas e dieta rica em proteínas os girinos consigam ultrapassar os efeitos negativos que a temperatura pode ter ao nível do tamanho e da locomoção (Álvarez e Nicieza, 2002b). A inclusão de um tratamento no qual é oferecida aos girinos uma dieta mista é uma inovação deste trabalho e visa testar a capacidade de escolha dos girinos. Espera-se que na dieta mista estes escolham o alimento que possibilite o melhor crescimento e desenvolvimento. Nestes casos é expectável que em temperaturas quentes estes se alimentem preferencialmente da dieta animal em detrimento da dieta vegetal.

Metodologia

A espécie estudada, *Discoglossus galganoi* (Capula, Nascetti, Lanza, Bullini e Crespo 1985)

Discoglossus galganoi pertence à família Discoglossidae e ao género *Discoglossus*, o qual engloba cinco espécies morfológicamente semelhantes (Martínez-Solano, 2004). Na Península Ibérica existem duas linhagens endémicas: *D. galganoi*, classificada pelo ICNB como quase ameaçada (Cabral *et al.*, 2005) e *D. jeanneae*, apenas encontrada na metade leste da Península Ibérica. Em Portugal *D. galganoi* distribui-se por todo o país apesar de em núcleos populacionais fragmentados, podendo ser localmente abundante. Habita preferencialmente as imediações de massas de água com algum coberto vegetal e terrenos encharcados (Cabral *et al.*, 2005). A época de reprodução é bastante variável, estendendo-se desde inícios do Inverno até finais do Verão (Ferrand de Almeida *et al.*, 2001). No entanto, no sul do país a reprodução é concentrada nos meses de Inverno e início da Primavera (Rebelo *et al.*, 2009). O amplexo é inguinal e ocorre em pequenos corpos de água, como charcos temporários e/ou semi-permanentes (Álvarez e Nicieza, 2002a; Ferrand de Almeida *et al.*, 2001). A fêmea acasala com vários machos e deposita cerca de 326 a 687 ovos por cópula. No total podem colocar 1350 a 1500 ovos em posturas sucessivas (García-París, 2004). A eclosão demora entre 2 a 9 dias, dependendo da temperatura da água (Ferrand de Almeida *et al.*, 2001). Assim, na Primavera com a subida da temperatura da água o tempo até à eclosão é mais curto que durante o Inverno (Mitchell e Seymour, 2000). Os girinos são caracterizados por possuírem o espiráculo em posição ventral e mediano e terem tamanho reduzido, entre 25 a 35 mm. Têm uma cor escura, quase preta, tornando-se progressivamente mais claros. O período larvar dura cerca de 20 a 60 dias (Ferrand de Almeida *et al.*, 2001), dependendo da temperatura da água (Álvarez e Nicieza, 2002a; Álvarez e Nicieza, 2002b; Liess *et al.*, 2013), a qual constitui um dos principais factores que influencia o tamanho à metamorfose e a duração do período larvar (Smith-Gill e Berven, 1979). Os girinos são omnívoros e canibais facultativos (Álvarez e Nicieza, 2002a) e a sua dieta pode variar temporal e espacialmente (Altig *et al.*, 2007).

Área de estudo

Na região da Serra de Grândola o clima é mediterrânico (Rebelo *et al.*, 2009) com influência atlântica (Pereira, 2011). Este clima caracteriza-se por uma elevada sazonalidade da precipitação e uma elevada disparidade de temperaturas, com Verões quentes e secos e Invernos frios e húmidos (Bonada e Resh, 2013). A precipitação média anual é de 500 mm, a temperatura média anual é de 15,6 °C e o período xérico de 3 a 4 meses (Rebelo *et al.*, 2009). Como consequência da sazonalidade da precipitação, o regime de fluxo dos rios, ribeiras e

charcos apresenta um período de alagamento que corresponde ao período das chuvas e um período de contracção que corresponde ao período de seca (Bernal *et al.*, 2013; Bonada e Resh, 2013; Canha e Pinto, 2010).

Na região da Serra de Grândola os charcos temporários têm em média um hidroperíodo de 6 a 7 meses, uma profundidade entre 20 e 150 cm e uma área entre 25 a 529 m². Quanto às características abióticas têm em média uma temperatura de 16,68°C, uma salinidade de 8,18mg/kg e um pH de 7,44, apresentando estes valores variações marcadas ao longo das estações do ano. Os macroinvertebrados mais comuns nestes charcos pertencem às ordens Ephemeroptera, Plecoptera, Odonata, Coleoptera, Heteroptera, Anostraca e Decapoda (Pereira, 2011). A vegetação é dominada por herbáceas anuais e herbáceas perenes que aparecem durante o Inverno e a Primavera (Pinto-Cruz, 2009). Nos charcos de Grândola as mais abundantes são as espécies *Juncus heterophyllus*, uma macrófita emergente e *Ranunculus peltatus*, uma macrófita flutuante (Pereira, 2011; Pinto-Cruz, 2009).

Colheita das posturas

As posturas de *D.galganoi* foram colhidas na Herdade da Ribeira Abaixo (HRA, latitude: 38° 05' N - 38° 08' N; longitude: 8° 33' W - 8° 38' W), que se localiza na região Este da Serra de Grândola, na Freguesia de Santa Margarida da Serra. A estação de campo do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa localiza-se numa área de Montado de sobro, com matos de *Cisto – Lavanduletae* e é atravessada por várias ribeiras temporárias que drenam para a Ribeira de Castelhanos (Rebelo *et al.*, 2009).

Durante os meses de Outubro de 2013 a Janeiro de 2014 foi feita uma prospecção preliminar do terreno, de modo a localizar os charcos com maior probabilidade de ocorrência de posturas e as suas localizações foram registadas num GPS. A recolha de posturas decorreu no dia 6 de Janeiro de 2014, num charco da HRA (38°6'12.4"N 8°34'25"W) com as dimensões de 1,23 por 0,72 m, e uma profundidade de 5 cm. Foram recolhidos aproximadamente 1880 ovos, que supõe-se corresponderem a 2 ou 3 posturas. Relativamente aos parâmetros abióticos da água, a salinidade era de 6,92 mg/L, a condutividade de 9,54 mS/cm e o pH de 8,77 (medidos com um medidor multiparamétrico YSI 556 MPS).

Procedimento experimental

A experiência foi realizada no Biotério da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e decorreu de 6 de Janeiro a 17 de Julho de 2014.

Os ovos foram mantidos em caixas de plástico (dimensão: 10,5 x 10,5 cm) preenchidas com 1L de água envelhecida até os girinos atingirem o estágio Gosner 25 (Gosner, 1960), a partir do qual os girinos nadam livremente e iniciam a procura de alimento (Gosner, 1960).

Em experiências preliminares (com a duração de 8 dias) foram testadas 6 dietas diferentes com o objectivo de averiguar quais as mais adequadas para utilizar na experiência. Foram testadas folhada proveniente do fundo do charco, Junco-de-folhas-variadas (*Juncus heterophyllus*), *Callitriche brutia*, larvas de quironómídeo (Diptera, Insecta), ração de peixe comercial (Tetra PondSticks®, Germany) e ração de coelho comercial (Vitakraft Nibble Ring®, Germany). Cada dieta foi testada em 4 girinos, alimentados *ad libitum* 3 vezes por semana. A água foi mudada 2 vezes por semana. A temperatura da água foi mantida a 20°C, com o auxílio de termóstatos (BOY-U®) e o fotoperíodo foi 12L:12E (garantido através da utilização de luz artificial).

As dietas seleccionadas foram larvas de quironómídeo e Junco-de-folhas-variadas, ambos possíveis de encontrar em charcos temporários do Sudoeste de Portugal e da HRA (Pereira, 2011; Trigo *et al.*, 2007).

Desenho experimental

O desenho experimental foi factorial completo. Incluiu 3 dietas e 4 temperaturas diferentes. Cada combinação foi replicada 28 vezes, resultando em 336 unidades experimentais, cada uma consistindo num recipiente cilíndrico transparente (dimensões: 9 cm de diâmetro e 10 cm de altura) preenchido com 0,3L de água envelhecida. Cada recipiente, contendo um girino, foi colocado num tanque/bloco espacial (dimensões: 70 x 45 cm) preenchido com 30L de água (Figura 1).

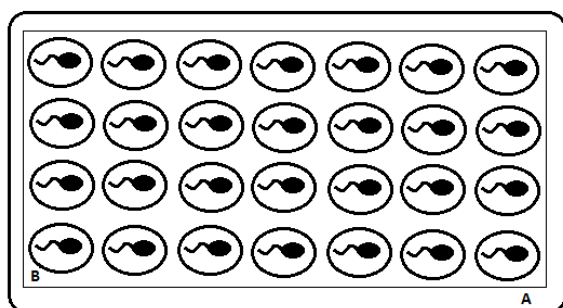


Figura 1 - Esquema da unidade experimental. “A” corresponde ao tanque/bloco preenchido com 30L de água. “B” corresponde ao recipiente individual, cada um contendo um girino. No total foram usados 12 tanques.

Os 4 tratamentos térmicos foram: primavera fria, temperatura constante de 15°C (F); primavera quente, temperatura constante de 25°C (Q); primavera normal, elevação regular (1°C por semana) da temperatura de 15°C até 25°C (N); e onda de calor, igual ao tratamento

primavera normal, ao qual se sobrepôs um pico de temperatura de 25°C durante 12 dias (OC). Na Tabela 1 encontra-se esquematizado o aumento semanal da temperatura da água nos tratamentos primavera normal e onda de calor.

Tabela 1 - Aumento da temperatura nos tratamentos primavera normal (N) e onda de calor (OC) e dia correspondente. Os 25°C a negrito correspondem aos dias de exposição à onda de calor.

Dia	Temperatura (°C)	
	Tratamento N	Tratamento OC
0	15	15
7	16	16
14	17	17
21	18	18
28	19	19
30	19	25
35	20	25
42	21	20
49	22	21
56	23	23
63	24	24
70	25	25

A temperatura do biotério foi mantida a 15°C com auxílio de um aparelho de ar condicionado. Foram utilizados termóstatos (BOY-U®) para aumentar a temperatura da água dos tratamentos primavera normal, onda de calor e primavera quente. A temperatura dos tanques/blocos espaciais foi monitorizada diariamente, de manhã e de tarde. Sempre que houve alguma desregulação ajustou-se a temperatura do termóstato à temperatura requerida, havendo uma terceira verificação.

Antes do início da experiência todos os girinos foram alimentados com ração de peixe comercial (Tetra PondSticks®, Germany), durante 8 dias, para acelerar o seu crescimento.

Posteriormente, as 3 dietas testadas foram: macrófita *J. heterophyllus* (dieta “planta” – P; pobre em proteínas), larvas de quironomídeo (dieta “animal” – A; rica em proteínas) e *J. heterophyllus* juntamente com larvas de quironomídeo (dieta mista, M).

No início da experiência (dia 0) os girinos no estágio Gosner 25 (Gosner, 1960) foram adicionados aos recipientes individuais e alimentados *ad libitum* 3 vezes por semana. A água foi mudada 2 vezes por semana e os girinos foram mantidos sob um fotoperíodo de 12L:12E (garantido através da utilização de luz artificial). No dia 46 da experiência foram retirados girinos (n=14) de todos os tratamentos, que foram utilizados num outro estudo, mantendo os restantes girinos em experiência até estes completarem a metamorfose.

Monitorização de parâmetros morfológicos, de desenvolvimento e comportamentais

No início da experiência (dia 1) e no dia 46, os girinos foram fotografados contra uma escala milimétrica e o comprimento da cabeça foi medido a partir de fotografias digitais. No dia 46 foi também identificado o estágio de desenvolvimento dos girinos, seguindo a escala de Gosner (1960). Após completarem a metamorfose (estádio Gosner 46), os recém-metamorfoseados foram fotografados contra uma escala milimétrica, medindo-se o comprimento do corpo (*snout-urostyle-length* - SUL) e o comprimento da tibia (*tibia-length* - TL). Os parâmetros morfológicos mencionados anteriormente foram obtidos através da medição das imagens digitais com o auxílio do programa ImageJ, versão 1.45. Adicionalmente, os recém-metamorfoseados foram ainda pesados numa balança com precisão centesimal.

O período larvar foi calculado como o número de dias que decorreu desde o início da experiência até à chegada ao estágio Gosner 42 (início da metamorfose). Foram registados todos os casos de mortalidade antes da chegada ao estágio Gosner 42.

A experiência terminou no dia 164. Nesse dia restavam 13 girinos da combinação de tratamento primavera fria com dieta planta, dos quais apenas um num estágio de desenvolvimento avançado. Esse animal foi seguido até à metamorfose; os restantes, todos ainda entre os estádios Gosner 34 e 36, foram retirados da experiência.

Para estudar as respostas comportamentais dos girinos aos tratamentos experimentais, os seus comportamentos foram registados em 3 datas distintas: a primeira no dia 29 (prévio à onda de calor); a segunda no dia 38 (durante a onda de calor); e a terceira no dia 45 (após a onda de calor). Em cada data realizaram-se 5 sessões de observação comportamental, onde se registou actividade (nadar e/ou comer) ou inactividade (parado) dos girinos no momento da observação.

Para avaliar a capacidade de salto dos recém-metamorfoseados realizou-se uma sessão de saltos no final da metamorfose (estádio Gosner 46). Cada sessão consistiu em 10 saltos consecutivos realizados numa superfície lisa e clara. Cada salto foi marcado com um ponto e medido posteriormente. Os parâmetros calculados foram: o comprimento médio dos

três saltos mais longos – capacidade de fuga; e a diferença entre o comprimento médio dos três últimos saltos e o comprimento médio dos três primeiros saltos – resistência.

Tratamento estatístico

Para averiguar a existência de diferenças no comportamento dos girinos sujeitos aos vários tratamentos experimentais nas diferentes datas foi realizado um Modelo Linear Generalizado Misto - GLMM, com uma distribuição binomial e *link function* logit. A variável dependente utilizada foi a actividade (estar ou não activo em cada sessão de cada data). A temperatura, a dieta e a datas foram incluídos no modelo como factores fixos. Como factores aleatórios utilizou-se a sessão em que cada comportamento foi registado e o indivíduo. O teste *a posteriori* utilizado para detectar as diferenças foi o teste sequencial de Bonferroni.

Para testar o efeito dos tratamentos experimentais no comprimento da cabeça e no estágio de desenvolvimento dos girinos no dia 46 recorreu-se a Modelos Lineares generalizados - GLM. Assim, a temperatura (4 níveis) e a dieta (3 níveis) foram definidas como factores fixos, testando-se ainda a sua interacção. No caso da variável comprimento da cabeça no dia 46, utilizou-se como co-variável o comprimento da cabeça dos girinos no dia 0.

Para as análises das variáveis referentes aos recém-metamorfoseados foram seleccionados apenas os primeiros 75% dos girinos a metamorfosear-se em cada combinação de tratamentos, para evitar desvios à normalidade provenientes de caudas pesadas na distribuição da duração do período larvar. Dada a elevada mortalidade nas combinações de tratamentos que incluíram a dieta planta, as análises relativas aos recém-metamorfoseados restringiram-se aos provenientes das combinações de tratamentos com dietas animal e mista. O efeito dos tratamentos experimentais no período larvar, no SUL, no TL, no peso, na capacidade de fuga e na resistência foram testados com GLM. Tal como nos girinos, a temperatura (4 níveis) e a dieta (3 níveis) foram definidas como factores fixos, testando-se também a sua interacção. No caso das variáveis peso dos recém-metamorfoseados e comprimento da tibia, realizou-se uma primeira análise com os dados em bruto e uma segunda análise utilizando o SUL como co-variável. Para comparar os parâmetros dos saltos dos recém-metamorfoseados foi utilizada como co-variável o TL.

O GLMM relativo ao comportamento dos girinos foi realizado com o programa IBM SPSS Statistics (versão 21). A normalidade dos dados e os GLMs sobre os parâmetros relativos aos girinos e aos recém-metamorfoseados foram testados com o programa Statistica (versão 11), utilizando o teste *a posteriori* Bonferroni quando se encontraram diferenças significativas. Em todos os testes o nível de significância considerado foi 0,05. A homogeneidade de

variâncias foi verificada através do teste Shapiro-Wilk e, apesar da ausência de homocedasticidade em alguns casos, optou-se ainda assim utilizar GLMs. Segundo Underwood (1997), quando existem 5 ou mais tratamentos com N igual ao superior a 6, a experiência é equilibrada e a validade do teste e a probabilidade associada à distribuição de F não são muito afectadas por esta violação.

Resultados

Girinos

Comportamento

O comportamento dos girinos foi influenciado pela interacção entre a data, a temperatura e a dieta (GLMM, $F_{12,4.35} = 2,041$, $P = 0,018$) (Figura 2). Dada a existência de interacções significativas, as comparações foram realizadas caso a caso.

No tratamento F a actividade dos girinos não variou entre dietas nem entre datas. De um modo geral a actividade foi baixa, notando-se uma tendência, ainda que não significativa, de actividade menor nos girinos sujeitos às dietas A e P (Figura 2).

No tratamento Q houve diferenças na actividade dos girinos. A actividade foi diferente entre os dias 29 e 38 na dieta M, observando-se menor actividade no dia 38. Na dieta P a actividade diferiu entre as datas 29 e 45, observando-se especial aumento da actividade no período mais tardio, no dia 45. A actividade dos girinos com dieta A não variou ao longo do tempo.

No tratamento N não houve diferenças na actividade dos girinos nas três datas nem nas três dietas. Contudo, observou-se uma tendência de maior actividade nas dietas M e P, apesar de não ser significativo.

No tratamento OC detectaram-se diferenças na actividade dos girinos nas dietas A e P. A actividade especialmente elevada observada no dia 29 nestas dietas, quando comparada com a actividade dos animais do tratamento N não tem uma explicação óbvia, uma vez que nessa data encontravam-se nas mesmas condições térmicas. Observou-se uma diminuição da actividade no dia 38 na dieta P, correspondendo à exposição à onda de calor. A actividade dos girinos sujeitos à dieta M não variou ao longo do tempo. Apesar de não ser significativo, notou-se uma tendência de diminuição da actividade nas dietas A e M no dia 38.

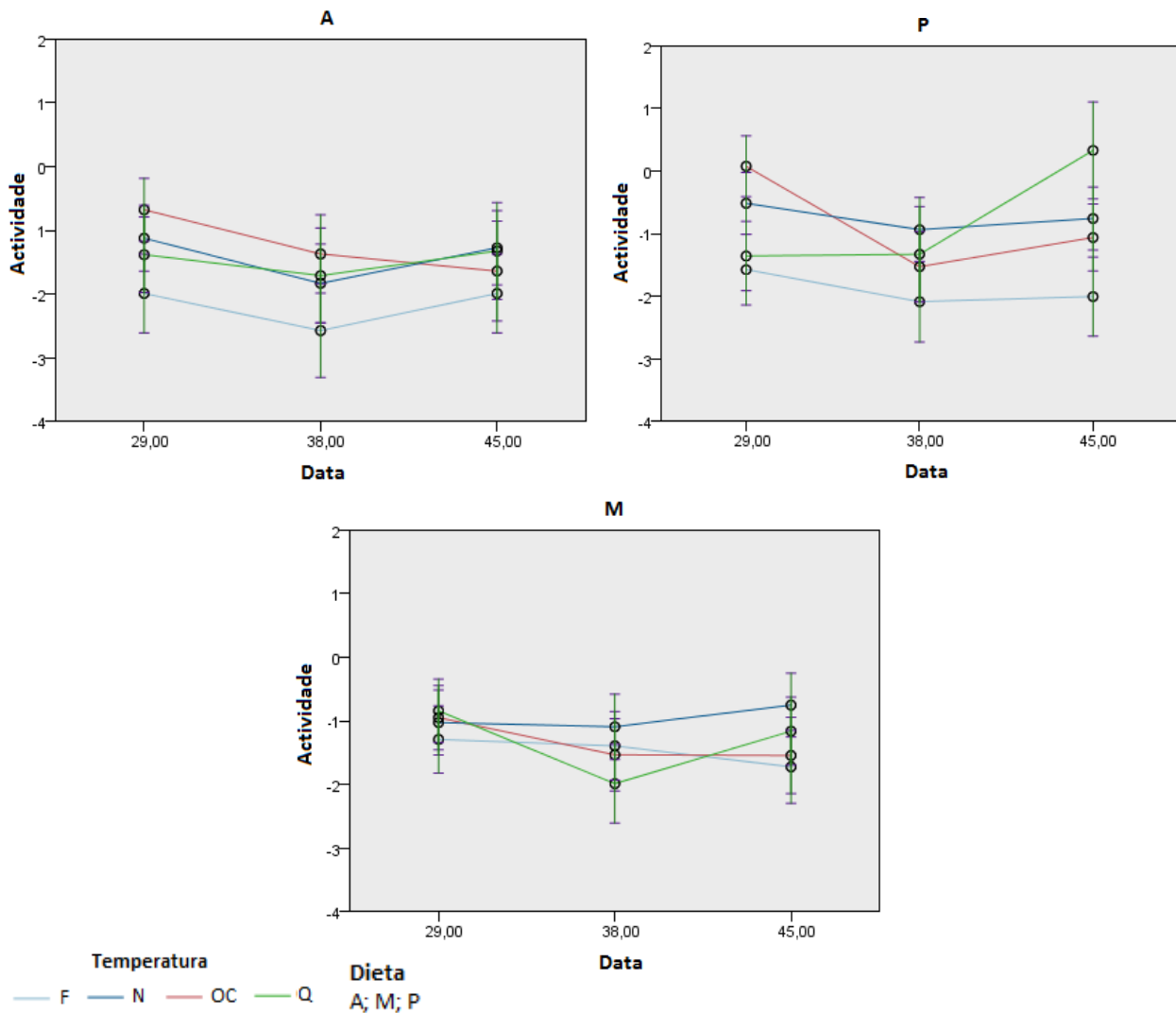


Figura 2 – Actividade dos girinos nas três datas de monitorização. Os valores das ordenadas referem-se à diferença entre a actividade média de cada combinação de tratamentos e a actividade média de todos os animais experimentais. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “P” – dieta com *J. heterophyllus*, “A” – dieta com larvas de quironómideo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Comprimento da cabeça

O comprimento da cabeça foi influenciado pela temperatura (GLM, $F_{3, 262} = 11,0466$, $P < 0,0001$), pela dieta (GLM, $F_{2, 262} = 269,5909$, $P < 0,0001$) e pela interacção entre estes dois factores (GLM, $F_{6, 262} = 4,3488$, $P < 0,001$). Dada a existência de interacções significativas, as comparações foram realizadas caso a caso.

É possível observar na Figura 3 o menor tamanho da cabeça em todos os girinos da dieta P, independentemente da temperatura (entre os 5,5 e os 7 mm), notando-se um comprimento especialmente diminuto nos girinos do tratamento Q. Os girinos da dieta M apresentaram comprimento da cabeça intermédio ($8,5 \pm 0,07$ mm). Os girinos da dieta A

apresentaram comprimento da cabeça maior ($8,9 \pm 0,01$ mm). Apesar de não serem significativamente diferentes entre si, no tratamento OC, os girinos da dieta A apresentaram comprimento da cabeça maior comparados com os girinos da dieta M (diferença de 0,87 mm).

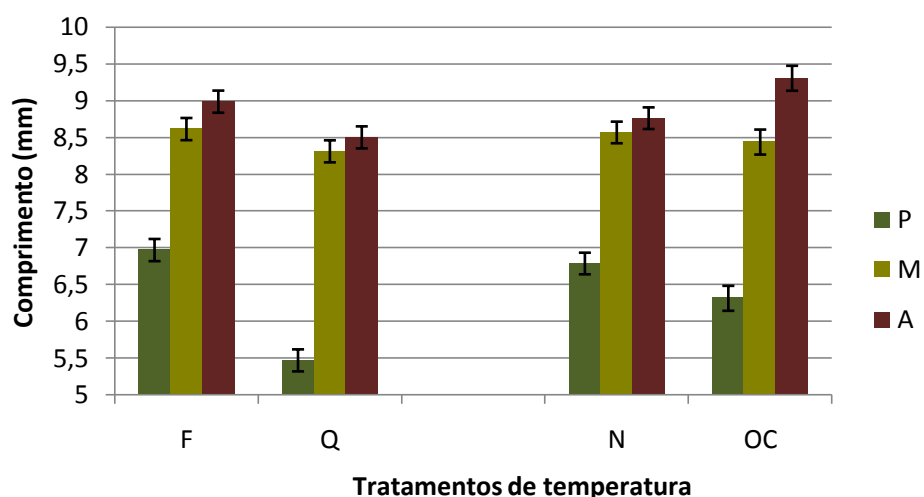


Figura 3 - Comprimento da cabeça dos girinos no dia 46. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “P” – dieta com *J. heterophyllus*, “A” – dieta com larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Estádio de desenvolvimento

A temperatura (GLM, $F_{3,262} = 8,92$, $P < 0,0001$) e a dieta (GLM, $F_{2, 262} = 597,30$, $P < 0,0001$) influenciaram o estágio de desenvolvimento no dia 46 e observou-se interação entre estes dois factores (GLM, $F_{6,262} = 4,31$, $P < 0,001$). Dada a existência de interações significativas, as comparações foram realizadas caso a caso.

Na Figura 4 observa-se que, independentemente da temperatura, os girinos alimentados com P encontravam-se em estádios de desenvolvimento iniciais (Gosner $25 \pm 0,22$). No tratamento F os girinos da dieta M encontravam-se em estádios de desenvolvimento menos avançados comparados com os girinos dos restantes tratamentos com as dietas A e M (estádio Gosner $33 \pm 0,41$). O inverso ocorreu no tratamento Q, onde os girinos com dieta M se encontravam num estágio de desenvolvimento mais avançado que os da dieta A (Figura 4). Contudo, estas diferenças não foram significativas.

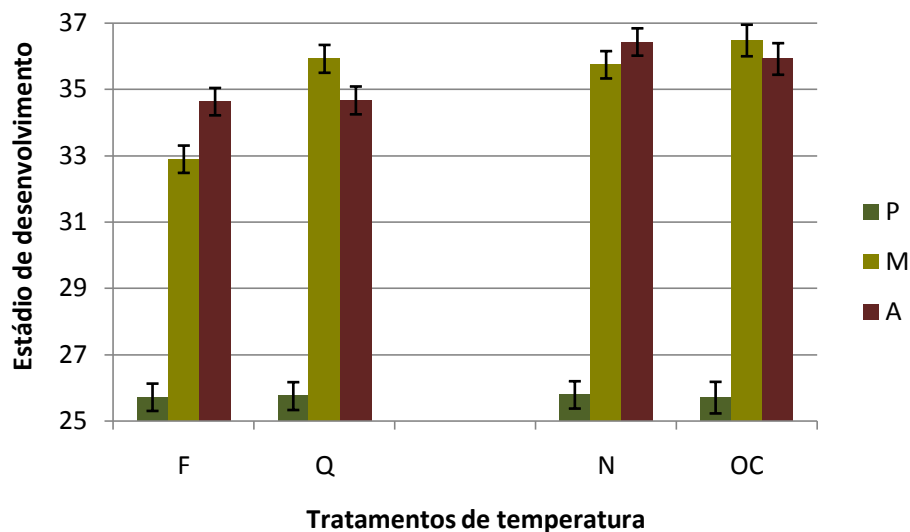


Figura 4 - Estádio de desenvolvimento dos girinos no dia 46. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “P” – dieta com *J. heterophyllus*, “A” – dieta com larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Mortalidade

A mortalidade foi nula nos tratamentos F e OC com dieta M. Os tratamentos que causaram as maiores percentagens de mortalidade ocorreram todos com a dieta P: OC (100 %), Q (100 %), N (93 %) e F (21 %) (Figura 5). Com apenas duas exceções, os girinos sujeitos à combinação de tratamentos FP e NP não se metamorfosearam durante o decurso da experiência. Dada a elevada mortalidade nas combinações de tratamentos que incluíram a dieta P, as análises relativas aos recém-metamorfoseados restringiram-se aos provenientes das combinações de tratamentos com dietas animal e mista.

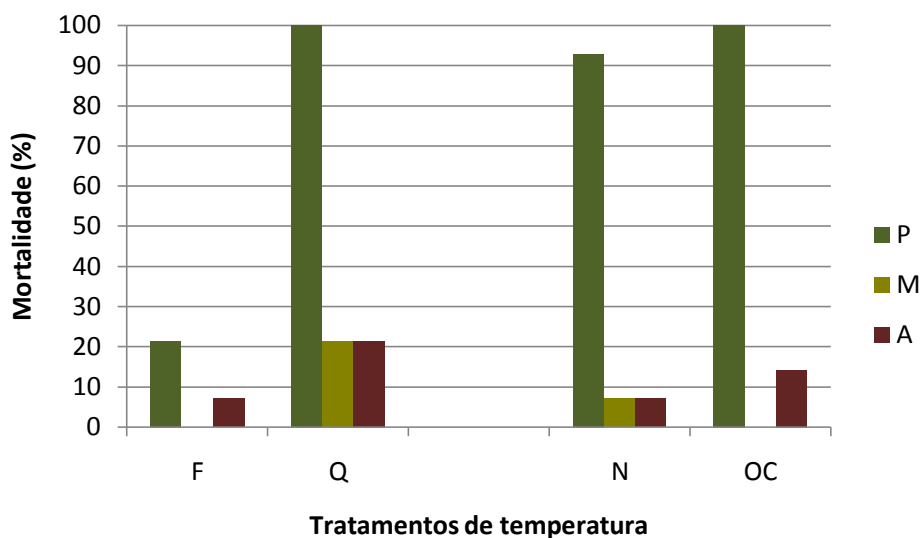


Figura 5 - Mortalidade em cada combinação de tratamento. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “P” – dieta com *J. heterophyllus*, “A” – dieta com larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista.

Período larvar

O período larvar não foi influenciado pela interação entre a temperatura e a dieta (GLM, $F_{3, 74} = 1,213$, $P = 0,31$). A temperatura influenciou muito significativamente a sua duração (GLM, $F_{3, 74} = 26,727$, $P < 0,0001$). As diferenças encontradas foram entre o tratamento F e os restantes: os girinos pertencentes ao tratamento F apresentaram um período larvar quase 30 dias maior que os restantes ($79 \pm 2,48$ dias), como é possível observar na Figura 6. Apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa, os girinos pertencentes ao tratamento OC apresentaram o período larvar menor ($50 \pm 2,48$ dias), enquanto os períodos larvares dos girinos pertencentes aos tratamentos N e Q foram semelhantes ($56 \pm 2,67$ e $55 \pm 2,86$ dias, respectivamente). A dieta também influenciou este parâmetro (GLM, $F_{1, 74} = 19,919$, $P < 0,0001$). Apenas dois indivíduos com dieta P chegaram à metamorfose (estádio Gosner 42): um no tratamento F, tendo demorado 168 dias; outro no tratamento N, com 158 dias. A Figura 6 ilustra o período larvar dos girinos com dietas A e M. É possível observar o menor período larvar dos girinos com dieta A ($54 \pm 1,74$ dias) quando comparados com os girinos com dieta M ($66 \pm 1,97$ dias). Independentemente da temperatura, os girinos com dieta M apresentaram períodos larvares maiores. Esta diferença foi mais marcada nos girinos do tratamento Q (diferença média de 20 dias) (Figura 6).

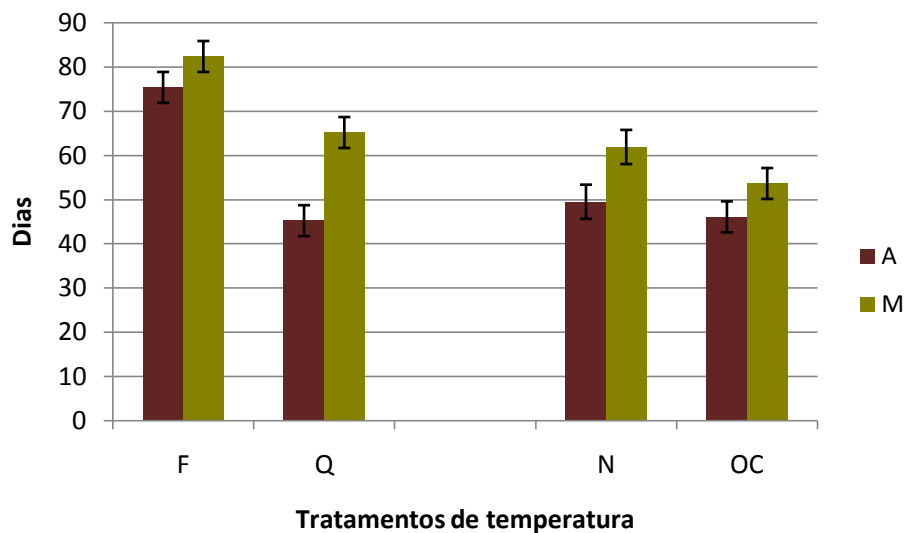


Figura 6 – Duração do período larvar. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “A” – dieta com larvas de quironomídeo, “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Recém-metamorfoseados

Comprimento do corpo

O comprimento do corpo não foi influenciado pela interação entre a temperatura e a dieta (GLM, $F_{3, 77} = 1,78$, $P = 0,16$). A temperatura influenciou o SUL dos recém-metamorfoseados (GLM, $F_{3, 77} = 52,59$, $P < 0,0001$). As diferenças encontradas foram entre o tratamento F e os restantes e entre os tratamentos N e OC. Os girinos pertencentes ao tratamento F apresentaram SUL maior ($9 \pm 0,12$ mm). Os girinos dos tratamentos N e Q apresentaram SUL intermédio ($7,5 \pm 0,12$, $7,5 \pm 0,14$ mm, respectivamente). Os girinos pertencentes ao tratamento OC apresentaram SUL menor ($7 \pm 0,12$ mm). A dieta influenciou o SUL dos recém-metamorfoseados (GLM, $F_{1, 77} = 6,02$, $P = 0,016$). Os girinos com dieta A apresentaram SUL maior ($7,9 \pm 0,08$ mm) comparados com os girinos com dieta M ($7,6 \pm 0,09$ mm). No tratamento OC os girinos com dieta A apresentaram SUL maior comparados com os girinos com dieta M (diferença de tamanho de 0,78 mm) (Figura 7).

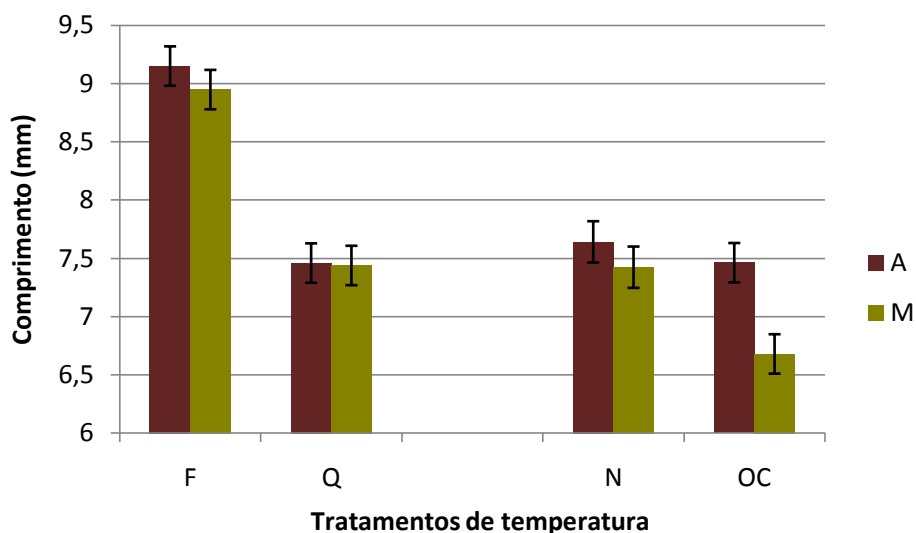


Figura 7 - Comprimento do corpo dos recém-metamorfoseados. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “A” – dieta com larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Comprimento da tibia

Houve interação entre os efeitos da temperatura e da dieta neste parâmetro (GLM, $F_{3, 77} = 3,124$, $P = 0,03$), ilustrada na Figura 8. Utilizando o SUL como co-variável a interação deixou de existir (GLM, $F_{3, 77} = 1,54665$, $P = 0,21$). No tratamento OC os recém-metamorfoseados com dieta A exibiram TL maior comparado com o dos sujeitos à dieta M, ao contrário do que aconteceu nos restantes tratamentos, onde o TL foi semelhante em ambas as dietas (Figura 8).

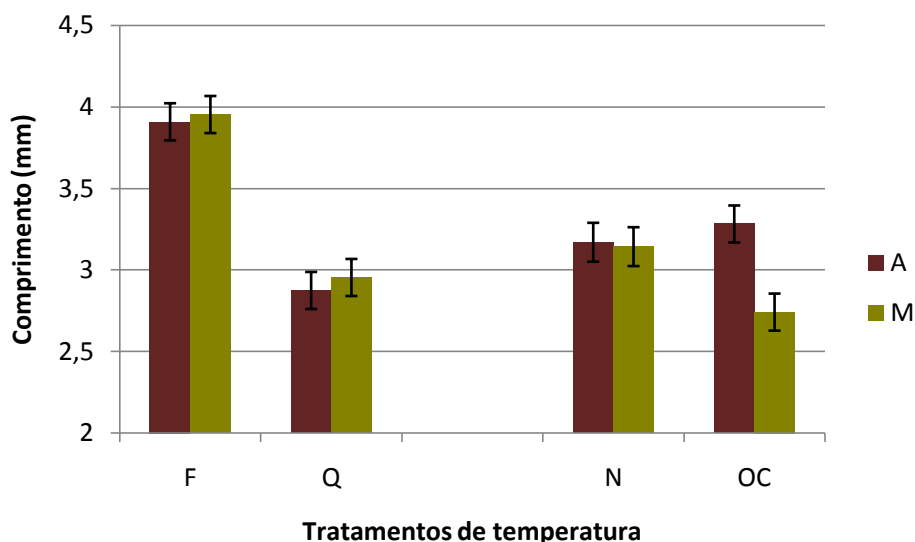


Figura 8 - Comprimento da tíbia dos recém-metamorfoseados. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “A” – dieta com larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

A temperatura influenciou o TL dos recém-metamorfoseados, e a inclusão do SUL como co-variável não alterou o resultado dos testes (GLM, $F_{3, 77} = 3,97340$, $P = 0,01$; $F_{3, 77} = 31,524$, $P < 0,0001$, respectivamente). Houve diferenças entre o tratamento F e os restantes em ambas as análises: os girinos do tratamento F apresentaram TL maior ($3,9 \pm 0,08$ mm). Os girinos dos tratamentos N, OC e Q apresentaram TL semelhante ($3,2 \pm 0,08$, $3 \pm 0,08$, $2,9 \pm 0,09$ mm, respectivamente) (Figura 8). A dieta não influenciou o TL com ou sem a utilização do SUL como co-variável (GLM, $F_{1, 77} = 0,01411$, $P = 0,91$; $F_{1, 77} = 1,747$, $P = 0,19$, respectivamente). Os recém-metamorfoseados provenientes das dietas A e M apresentaram TL semelhante ($3,3 \pm 0,05$ e $3,2 \pm 0,06$ mm).

Peso

O peso não foi influenciado pela interação entre a temperatura e a dieta e a inclusão da co-variável SUL não alterou o resultado (GLM, $F_{3, 77} = 1,744$, $P = 0,17$; $F_{3, 77} = 0,62104$, $P = 0,60$, respectivamente). Os tratamentos de temperatura causaram diferenças significativas em ambas as análises (GLM, $F_{3, 77} = 53,539$, $P < 0,0001$; $F_{3, 77} = 3,92837$, $P = 0,012$). Relativamente ao peso as diferenças ocorreram entre o tratamento F e os restantes: os girinos do tratamento F tiveram peso maior (53 ± 1 mg). Os girinos dos tratamentos N, OC e Q tiveram pesos semelhantes (35 ± 1 , 30 ± 1 e 32 ± 2 mg, respectivamente) (Figura 9). Incluindo o SUL como co-variável, as diferenças ocorreram entre o tratamento F e os restantes e entre o tratamento N e

OC. Os girinos do tratamento F tiveram peso maior, seguidos dos girinos dos tratamentos N, OC e Q. Apesar de as diferenças não serem significativas, no tratamento OC os girinos da dieta M tiveram peso menor comparados com os girinos da dieta A (diferença de 9 mg) (Figura 9).

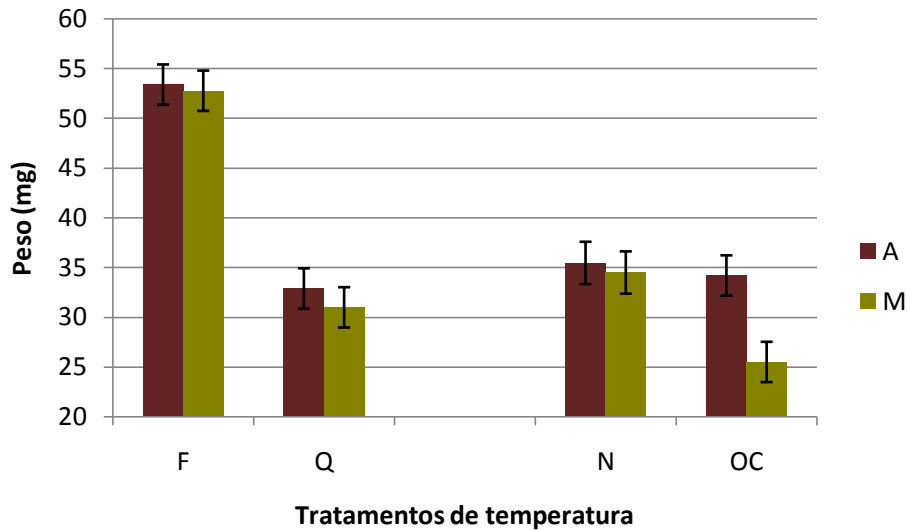


Figura 9 – Peso dos recém-metamorfoseados. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “A” – dieta com larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

O peso fresco dos recém-metamorfoseados foi influenciado pela dieta, mas a inclusão da co-variável SUL alterou esse resultado, deixando de ser significativo (GLM, $F_{1, 77} = 4,148$, $P = 0,045$; $F_{1, 77} = 0,16614$, $P = 0,68$, respectivamente). Os girinos da dieta A tiveram peso fresco maior comparado com os girinos da dieta M ($39 \pm 0,09$ e 36 ± 1 mg, respectivamente), devido ao seu maior SUL.

Saltos

Capacidade de fuga

Não foi observada interação entre a temperatura e a dieta (GLM, $F_{3, 77} = 0,96537$, $P = 0,41$) e capacidade de fuga não foi influenciada pela dieta (GLM, $F_{1, 77} = 0,23108$, $P = 0,63$). Os recém-metamorfoseados das dietas A e M tiveram saltos aproximados ($35 \pm 2,15$ e $33 \pm 2,47$ mm, respectivamente). A temperatura influenciou este parâmetro (GLM, $F_{3, 77} = 4,65744$, $P = 0,0048$). Detectaram-se diferenças entre o tratamento F e os restantes: os girinos do tratamento F apresentaram maior capacidade de fuga ($47 \pm 4,31$ mm). Apesar de não ser significativo, os girinos do tratamento OC apresentaram menor capacidade de fuga ($25,7 \pm 3,32$ mm), enquanto os girinos dos tratamentos N e Q saltaram distâncias intermédias ($30 \pm$

3,17 e $33 \pm 3,93$ mm, respectivamente). Na Figura 10 observa-se que no tratamento Q, os girinos da dieta A apresentaram maior capacidade de fuga que os girinos da dieta M (diferença de 11 mm), contudo esta diferença não foi significativa.

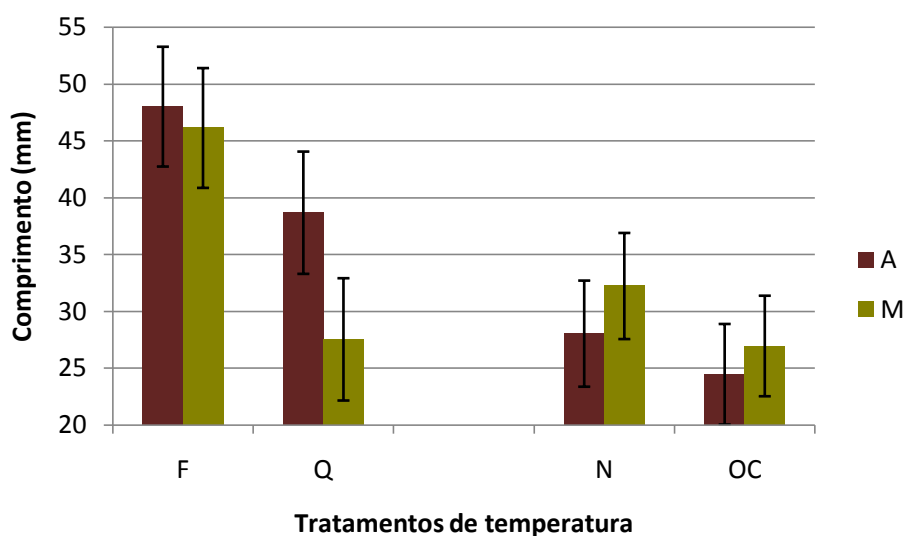


Figura 10 - Capacidade de fuga dos recém-metamorfoseados. “F” -primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “A” - larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Resistência

A resistência não foi influenciada pela temperatura (GLM, $F_{3, 77} = 0,648860$, $P = 0,59$), nem pela dieta (GLM, $F_{1, 77} = 0,366684$, $P = 0,55$), nem houve interação entre estes dois factores (GLM, $F_{3, 77} = 1,318692$, $P = 0,27$). A Figura 11 ilustra a resistência exibida pelos girinos de cada combinação de tratamentos. É possível observar que para todos os tratamentos a barra de erro se sobrepõe à reca $X=0$, que indica a ausência de fadiga. Valores positivos indicam resistência, enquanto valores negativos indicam falta de resistência. No tratamento F os recém-metamorfoseados da dieta A apresentaram resistência ($3,09 \pm 4,94$ mm), contrariamente aos girinos da dieta M ($-8,5 \pm 5,05$ mm). Por outro lado, no tratamento OC os recém-metamorfoseados da dieta M apresentaram resistência ($1,19 \pm 4,68$ mm), contrariamente aos girinos da dieta A ($-3,61 \pm 4,15$ mm). Para ambas as dietas no tratamento N houve fadiga, observando-se o inverso no tratamento Q, onde os recém-metamorfoseados de ambas as dietas não se cansaram no final dos 10 saltos.

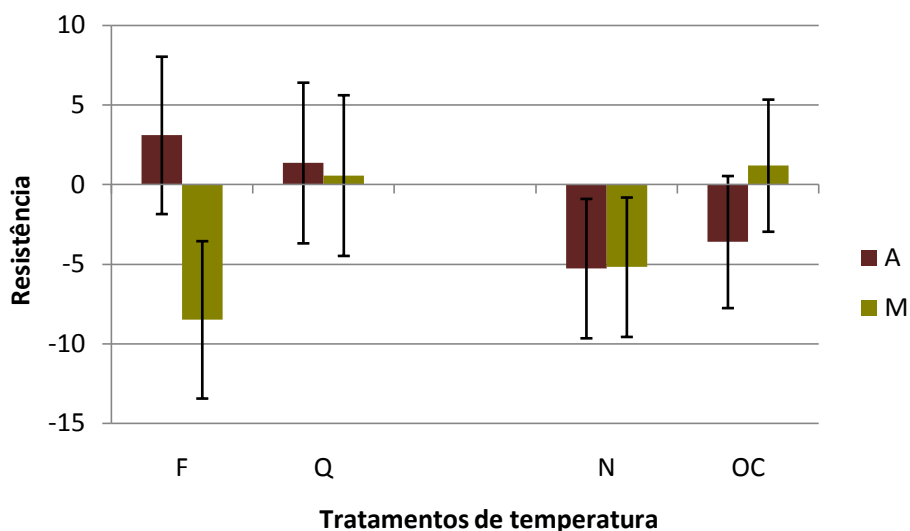


Figura 11 – Resistência exibida pelos recém-metamorfoseados. Valores positivos indicam resistência, enquanto valores negativos indicam falta de resistência. “F” - primavera fria, “N” - primavera normal, “OC” - onda de calor, “Q” - primavera quente, “A” - larvas de quironomídeo e “M” - dieta mista. As barras de erro representam o desvio padrão.

Discussão

O período de reprodução de *D. galganoi* no Sudoeste de Portugal estende-se, normalmente, entre os meses de Janeiro a Abril, com a maior parte das posturas efectuadas até ao início de Março. Este estudo mostrou que não é vantajoso atrasar a época de reprodução, a qual acontece normalmente durante o Inverno, pois esta espécie reproduz-se em charcos temporários, pequenos e pouco profundos (Escoriza e Boix, 2014). Assim, além do constrangimento causado pela dessecação destes habitats efémeros (Diaz-Paniagua, 1992), os girinos podem ficar expostos a ondas de calor que ocorram no início da Primavera. Se estas ondas de calor ocorrerem cedo na estação (Fevereiro/Março), as condições podem tornar-se muito desfavoráveis neste tipo de charcos, onde os girinos dependem essencialmente de macrófitas (pobres em proteínas). Este trabalho mostrou também que uma dieta rica em proteínas (dieta animal) é crucial para *D. galganoi* ter um crescimento rápido e completar a metamorfose com sucesso. Pelo contrário, uma dieta pobre em proteínas (matéria vegetal) pode ser catastrófica em cenários de aquecimento.

Efeitos da temperatura

Neste estudo a temperatura teve efeitos significativos em todos os parâmetros avaliados nos girinos e nos recém-metamorfoseados de *D. galganoi*. Este era um resultado esperado; de um modo geral, temperaturas frias promovem o aumento do tamanho corporal e

estendem a duração do período larvar dos anfíbios, enquanto temperaturas quentes aceleram o desenvolvimento larvar à custa de um tamanho menor na chegada à metamorfose (Blouin e Brown, 2000; Collins, 1979; Orizaola e Laurila, 2009b; Pandian e Marian, 1985b; Van der Have e Jong, 1996). Este padrão foi o observado no presente trabalho - os girinos sujeitos a temperaturas frias apresentaram tamanho maior (estando de acordo com a “temperature-size rule” (Atkinson, 1994)) e período larvar maior, enquanto os girinos sujeitos a temperaturas mais elevadas apresentaram períodos larvares mais curtos e tamanhos à metamorfose menores. Esta aceleração do crescimento e desenvolvimento com o aumento de temperatura pode ser vantajosa para os girinos de *D. galganoi*, visto encontrarem-se, regra geral, em corpos de água pequenos e poucos profundos - habitats com “tempo de vida” limitado (Escoriza e Boix, 2014). Neste tipo de habitat é benéfico crescer e desenvolver-se depressa, mesmo que à custa de tamanhos corporais menores, para completar a metamorfose com sucesso antes de o charco secar.

Os recém-metamorfoseados que cresceram sujeitos às temperaturas quentes (primavera normal, onda de calor e primavera quente) apresentaram membros posteriores menores, mesmo tendo em consideração o seu tamanho. O mesmo resultado tem sido encontrado por outros autores: num estudo realizado com 3 espécies diferentes, *Pseudacris triseriata*, *Bufo americanus* e *Rana pipiens*, Emerson (1978) observou que tamanhos maiores correlacionaram-se com membros posteriores maiores e com maior capacidade de salto. Num outro estudo realizado com 4 espécies diferentes, *Pelobates cultripes*, *Spea multiplicata*, *Spea intermontana* e *Scaphiopus holbrookii*, observou-se que a duração do período larvar esteve correlacionada positivamente com o tamanho à metamorfose e com o tamanho dos membros posteriores; períodos larvares longos deram origem a recém-metamorfoseados maiores com membros posteriores relativamente maiores (Gomez-Mestre e Buchholz, 2006). No entanto, há espécies nas quais esta relação não foi encontrada. Nos juvenis de *Rana cascadae*, os girinos sujeitos a temperaturas quentes desenvolveram membros maiores, independentemente do efeito da temperatura no tamanho corporal (Blouin e Brown, 2000).

O tamanho dos membros posteriores está positivamente correlacionado com a *performance* dos saltos dos anuros (Álvarez e Nicieza, 2002b; Emerson, 1978; Tejedo *et al.*, 2010), pelo que a diminuição do tamanho da tíbia nos tratamentos que incluíram temperaturas quentes influenciou a *performance* locomotora de um modo expectável. A *performance* locomotora é crucial para a sobrevivência e o crescimento inicial dos recém-metamorfoseados (Watkins, 2001). Independentemente da maior capacidade de salto, os recém-metamorfoseados maiores podem ter capacidades acrescidas de sobrevivência (escape

a predadores, resistência à fome, dessecação, etc.) e maiores tamanhos na maturação sexual (Tracy *et al.*, 1993; Smith, 1987).

Efeitos da Dieta

A dieta teve efeitos significativos em todos os parâmetros avaliados nos girinos e em alguns relativos aos recém-metamorfoseados, nomeadamente no tamanho corporal e no peso. No entanto, o efeito mais forte foi na sobrevivência dos girinos submetidos a uma dieta com macrófita. A mortalidade foi muito elevada nas combinações de tratamentos com dieta de planta, comprovando que esta dieta não é benéfica para os girinos de *D.galganoi*, o que é também uma indicação que na natureza esta espécie, tal como a maioria dos anuros (Altig *et al.*, 2007), não será exclusivamente herbívora. Todos os outros parâmetros testados também evidenciaram esta conclusão. A dieta à base de macrófita (pobre em proteínas) teve custos no crescimento (os girinos apresentaram tamanhos bastante reduzidos); teve custos no desenvolvimento (apresentaram estádios de desenvolvimento pouco avançados), mostrando como esta dieta desfavorável provoca o prolongamento anormal do período larvar. Por último, teve custos na *fitness*, visto que apenas 2 girinos alimentados com macrófita finalizaram a metamorfose. A quantidade e a qualidade da dieta influenciam o crescimento (Álvarez e Nicieza, 2002a; Kupferberg, 1997; Steinwascher e Travis, 1983), mas o seu papel sobre o desenvolvimento não é muito claro. Alguns estudos, um dos quais realizado também com *D. galganoi*, não encontraram influências da dieta sobre o desenvolvimento (Álvarez e Nicieza, 2002a; Crump, 1990; Martins *et al.*, 2013). No entanto, outros autores indicam que dietas ricas em proteínas podem promover o desenvolvimento, fazendo com que os girinos se metamorfoseiem mais cedo que os girinos sujeitos a alimentação pobre em proteínas (Kupferberg, 1997; Nicieza *et al.*, 2006; Pandian e Marian, 1985a). Num estudo conduzido por Pfennig (1990) observou-se que os girinos com uma dieta carnívora desenvolveram-se e metamorfosearam-se mais rapidamente que os girinos com uma dieta omnívora e Kupferberg (1997) observou que os girinos preferiam alimentar-se de algas com conteúdos proteicos relativamente elevados.

No caso de *D. galganoi* a dieta animal produziu metamórficos maiores e acelerou o desenvolvimento, diminuindo assim o período larvar, enquanto a dieta mista (qualidade menor) provocou o aumento do período larvar, ao contrário do previsto por Wilbur e Collins (1973). Portanto, a taxa de diferenciação foi de alguma forma sensível ao conteúdo da dieta. Na revisão realizada por Tejedo *et al.* (2010) verificou-se que o aumento do nível de recursos aumentou o tamanho dos membros posteriores dos recém-metamorfoseados. Contudo, num outro estudo realizado com *Hyla cinerea* verificou-se que a dieta não influenciou o tamanho

dos membros nos juvenis (Blouin e Loeb, 1991). Neste trabalho a dieta também não influenciou o tamanho dos membros posteriores. Como tal, é difícil estabelecer um padrão geral de como a dieta pode afectar o desenvolvimento dos membros posteriores dos juvenis e a sua capacidade de salto.

Interacções entre temperatura e dieta

O modo de forrageio dos girinos é activo; percorrem o seu habitat à procura de alimento (vegetação, detritos; presas, etc.), gastando elevadas quantidades de energia nessa procura (Vitt e Caldwell, 2009). A temperatura é um dos factores que influencia essa actividade e a sua subida causa um aumento dos níveis de forrageio (Beiswenger, 1977). Neste estudo observou-se que temperaturas quentes constantes provocaram um aumento da actividade ao longo do período larvar, especialmente em conjunto com uma dieta à base de macrófita. Esse aumento da actividade ao longo do tempo poderá não ter sido suficiente para garantir uma ingestão adequada de alimento, e ter levado à morte destes girinos, uma vez que todos os girinos sujeitos a uma temperatura constante de 25°C e a uma dieta vegetal morreram. À medida que a temperatura aumenta o consumo de energia também aumenta obrigatoriamente em animais ectotérmicos, sem que os indivíduos possam controlá-lo (Pandian e Marian, 1985a). Como tal, é expectável que os girinos desta combinação de tratamentos tenham aumentado a actividade de forma a consumir mais alimento para cumprir os requisitos energéticos necessários para o crescimento e o desenvolvimento. Noutros estudos observou-se que a sobrevivência foi menor nos tratamentos com dietas de baixa qualidade, mas essas dietas não impossibilitaram o alcance da metamorfose com sucesso (Kupferberg *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2013; Nathan e James, 1972). Pode-se inferir que para *D. galganoi* uma dieta estritamente herbívora não fornece os nutrientes e a energia necessários para chegar à metamorfose e os girinos acabam por morrer.

A dieta animal permitiu o aceleração do desenvolvimento no tratamento primavera fria enquanto a dieta mista permitiu o aceleração do desenvolvimento no tratamento primavera quente. O resultado observado para o tratamento primavera fria é expectável, pois dietas ricas em proteínas melhoram o crescimento e/ou desenvolvimento (Nathan e James, 1972; Pandian e Marian, 1985a; Steinwachser e Travis, 1983). A dieta mista pode ter acelerado o desenvolvimento na primavera quente pelo facto de a energia nos carboidratos, existentes em maiores quantidades na matéria vegetal (Kupferberg, 1997), estar mais acessível em comparação com a energia existente nas proteínas (Cook *et al.*, 2011). Por outro lado, como também têm acesso a proteína, esta combinação pode ter permitido um melhor desenvolvimento. As dietas animal e mista podem funcionar de modo contrário relativamente

ao desenvolvimento e ao crescimento, dependendo da temperatura. Observou-se que os recém-metamorfoseados provenientes da dieta mista nos tratamentos primavera fria e primavera normal eram mais pesados, enquanto nos tratamentos onda de calor e primavera quente os animais mais pesados foram os provenientes da dieta animal. O aumento da temperatura pode alterar o *uptake* e a incorporação dos nutrientes, influenciando a necessidade por determinada dieta (Liess *et al.*, 2013).

Os recém-metamorfoseados sujeitos ao frio apresentaram a melhor capacidade de salto seguidos dos recém-metamorfoseados do tratamento primavera quente com dieta animal. Nesta espécie, uma dieta carnívora pode conferir eficiência superior durante a metamorfose em ambientes quentes, por temperaturas elevadas poderem ter efeitos negativos ao nível do tamanho e da locomoção (Álvarez e Nicieza, 2002a).

Mas tanto nos outros trabalhos como neste foi observada a tendência para uma maior capacidade de salto de recém-metamorfoseados sujeitos a dieta rica em proteínas e temperaturas quentes comparados com os de dieta pobre em proteínas (Álvarez e Nicieza, 2002a).

Num estudo semelhante realizado com a mesma espécie (Álvarez e Nicieza, 2002a), mas com indivíduos capturados no norte de Espanha, foi estudado o efeito da temperatura e da qualidade da dieta na taxa de crescimento dos girinos. Aqui as temperaturas usadas (12, 17 e 22°C) foram constantes ao longo do tempo e as dietas pobre e rica em proteínas foram ração de coelho (17% de proteína) e de peixe (46% de proteína), respectivamente. Houve resultados semelhantes aos do presente estudo, nomeadamente, o aceleração do desenvolvimento em temperaturas quentes; a dieta rica em proteínas possibilitou maiores tamanhos nos girinos (mas apenas a 17°C) e recém-metamorfoseados maiores e mais pesados. As duas maiores diferenças entre o estudo destes autores e o do presente trabalho foram ao nível do desenvolvimento e da mortalidade dos girinos. Álvarez e Nicieza (2002a) não observaram influência da dieta no desenvolvimento, enquanto no presente estudo a dieta rica em proteínas possibilitou a redução do período larvar. Por outro lado, a sobrevivência foi elevada e uniforme em todas as combinações de tratamentos, ao contrário deste trabalho onde se verificou mortalidade elevada nos tratamentos com temperaturas quentes e dieta pobre em proteínas. Uma possível explicação para esta acentuada diferença na mortalidade é o facto de o alimento utilizado por Álvarez e Nicieza ser uma ração que, mesmo tendo um teor baixo de proteínas, continua a ser elevado em comparação com dietas naturais, como é o caso de *J. heterophyllus* e, portanto, os girinos poderão ter conseguido alcançar a metamorfose por terem acesso a proteínas. Por outro lado o efeito da temperatura também foi diferente

comparado com este estudo. No estudo de Álvarez e Nicieza o período larvar foi mais curto em todas as temperaturas e os recém-metamorfoseados foram menores quando comparados com os do presente estudo. Isto pode estar relacionado com o facto de as espécies estarem adaptadas a condições ambientais diferentes, visto a nossa população habitar o sudoeste de Portugal (altitude e latitude menor) em oposição às do outro estudo que provêm do norte de Espanha (altitude e latitude maior). Tais como outros estudos já sugeriram, temperaturas baixas associadas a locais de altitude e latitude elevadas restringem o tempo disponível para adquirir recursos e acumular energia (Hemelaar, 1988; Ryser, 1996), como tal, espécies de altitudes/ latitudes elevadas, normalmente, apresentam taxas de crescimento e desenvolvimento mais elevadas, devido ao facto de as estações favoráveis ao crescimento serem curtas (Licht, 1975; Lindgren e Laurila, 2005; Morrison e Hero, 2003).

Efeitos da onda de calor

A onda de teve efeitos sobre os girinos e sobre os recém-metamorfoseados. As principais diferenças foram: tamanho maior nos girinos com dieta animal; redução do período larvar (em ambas as dietas) e maior comprimento da tibia dos recém-metamorfoseados da dieta animal. Observou-se também que os custos da exposição à onda de calor foram minimizados (ou até anulados) pela dieta animal, mas não pela dieta mista.

Durante a exposição à onda de calor notou-se uma tendência de diminuição da actividade dos girinos. Esperava-se que o aumento súbito da temperatura provocasse stress e, conseqüentemente, aumento da actividade, o que não aconteceu. Uma possível explicação é o facto de os níveis de actividade poderem estar correlacionados com o estágio de desenvolvimento. Num estudo realizado com *Rana cascadae* observou-se que os níveis de actividade diminuiriam quando os girinos atingiram o clímax metamórfico (Wollmuth *et al.*, 1987). Como o período larvar médio no tratamento onda de calor foi de 50 dias, a diminuição da actividade média neste tratamento no dia 38 pode estar relacionada com a aproximação dos girinos à metamorfose.

Após a exposição à onda de calor os girinos com alimentação rica em proteínas apresentaram um tamanho médio maior que os girinos com a mesma dieta mas sujeitos ao tratamento primavera normal, mas essa diferença não foi significativa. O aumento da temperatura e a ingestão de material animal poderão ter actuado em conjunto acelerando as taxas de crescimento destes girinos (Crump, 1990; Heinen e Abdella, 2005; Tejedo *et al.*, 2010). O aumento repentino da temperatura terá também acelerado o desenvolvimento, pois os girinos deste tratamento tiveram períodos larvares menores, ainda que a diferença também não tenha sido significativa.

Houve diferenças no tamanho dos recém-metamorfoseados entre os tratamentos primavera normal e onda de calor. Houve custos inerentes ao desenvolvimento mais rápido, pois os girinos sujeitos à onda de calor metamorfosearam-se com tamanho mais diminuto. Neste grupo a dieta animal foi vantajosa, permitindo-lhes alcançar maiores tamanhos (semelhantes aos dos girinos que não passaram pela onda de calor), comparados com os da dieta mista.

Alguns estudos mostraram que pode existir uma relação negativa entre o período larvar e o tamanho relativo dos membros posteriores (Blouin e Brown, 2000; Nicieza *et al.*, 2006). Estes resultados coincidem com o deste estudo, mas apenas para os recém-metamorfoseados do tratamento onda de calor com dieta animal, que se desenvolveram mais depressa e apresentaram membros posteriores proporcionalmente maiores. Os indivíduos com elevada taxa de crescimento e rápido desenvolvimento podem estar expostos a concentrações elevadas de hormonas produzidas pela tiróide durante um curto período de tempo. Uma vez que estas hormonas regulam a metamorfose e o desenvolvimento dos membros, isto pode resultar no desenvolvimento de membros posteriores relativamente maiores (Emerson, 1986). No entanto, o maior tamanho dos membros posteriores neste grupo não resultou numa capacidade de salto acrescida, provavelmente porque aumentos reduzidos do tamanho dos membros posteriores não resultam no melhoramento significativo da performance (Richter-Boix *et al.*, 2006; Van Buskirk e Saker, 2001), sendo necessário um aumento de 10% do tamanho dos membros para haver influência substancial na locomoção (Emerson, 1978).

Os recém-metamorfoseados do tratamento onda de calor com dieta animal apresentaram peso maior que os deste tratamento com dieta mista; por outro lado este parâmetro foi semelhante aos dos indivíduos dos tratamentos primavera normal e quente com dieta animal. Comparando os efeitos das dietas animal e mista no crescimento e no desenvolvimento, observou-se que a dieta animal foi a única que conseguiu, de algum modo, compensar o efeito acelerador desencadeado pela onda de calor, permitindo aos girinos atingirem tamanhos à metamorfose relativamente maiores que os da dieta mista. Em termos de tamanho corporal parece ser muito vantajoso ter uma dieta rica em proteínas, principalmente quando a temperatura do meio aumenta.

Considerações finais

Durante a época de reprodução, *D. galganoi* enfrenta o constrangimento da dessecação dos habitats efêmeros onde as posturas são colocadas (Diaz-Paniagua, 1992). Este estudo mostrou que não é vantajoso atrasar a época de reprodução pois os girinos podem ficar expostos a onda de calor que possam acontecer no início da Primavera. Poderá também ser vantajoso que a reprodução aconteça relativamente cedo, ou seja, ainda durante o Inverno ou início da Primavera, pois possibilitará aos juvenis encontrarem condições no meio terrestre favoráveis ao seu crescimento e sobrevivência. Isto porque as taxas de crescimento dos juvenis no meio terrestre dependem da chuva. Quando chove a taxa de crescimento dos recém-metamorfoseados é maior, enquanto na época seca a taxa de crescimento é menor (Cabrera-Guzmán *et al.*, 2013). No entanto, antecipar demasiado a reprodução também tem riscos, relacionados com a possibilidade de congelamento dos charcos, caso as posturas sejam colocadas em pleno Inverno.

Observou-se que perante a possibilidade de escolha, o ideal é evitar uma dieta baseada maioritariamente em plantas, pois os seus efeitos em combinação com aumento da temperatura podem ser catastróficos. No entanto, os girinos que foram colocados perante essa escolha (os submetidos ao tratamento dieta mista), optaram por uma dieta que não foi a mais vantajosa. Como já foi referido acima, esta escolha pode ter implicações para a *fitness* do futuro juvenil e adulto, indicando que esta espécie não estará adaptada às consequências de alterações repentinas da temperatura.

Em charcos efêmeros tanto a cobertura de plantas como a existência de macroinvertebrados podem ser reduzidas (Grillas *et al.*, 2004). Como tal, sem uma dieta adequada pode ser difícil contrabalançar os efeitos negativos desencadeados pelo aumento da temperatura. Não existem muitos estudos semelhantes com espécies que se reproduzem em habitats efêmeros, mas num realizado com o sapo *Scaphiopus couchii* observou-se que uma dieta à base de plantas, pobre em proteínas, não é letal à medida que a temperatura aumenta e a duração dos charcos diminui (Newman, 1989). Isto indica que uma dieta baseada em plantas pode ser vantajosa para umas espécies e desfavorável para outras, mostrando assim a possível existência de adaptações diferentes por parte dos girinos de espécies diferentes. Por outro lado, uma dieta rica em proteínas pode ser importante em charcos oligotróficos ou em charcos com elevada densidade de girinos. Este cenário é provável no caso de *D. galganoi*, uma vez que se reproduz em corpos de água de pequenas dimensões e poucos profundos (Escoriza e Boix, 2014) que podem ter baixa produção de algas e onde a densidade larvar inicial pode ser elevada (Nicieza *et al.*, 2006). Perante estas condições um rápido desenvolvimento

e/ou crescimento permitido por uma dieta carnívora pode reduzir a mortalidade associada ao aumento da temperatura e à dissecação do charco, permitindo a chegada à metamorfose com sucesso em presença de temperaturas mais elevadas.

O aquecimento global poderá aumentar a temperatura do ar e alterar os regimes de pluviosidade em várias áreas do globo (IPCC 2007). Uma consequência deste aumento de temperatura será o aquecimento da temperatura nos charcos e os menores hidroperíodos destes habitats durante os anos secos (McMenamin *et al.*, 2008). A dessecação dos charcos impõe um grande constrangimento de tempo para o desenvolvimento larvar (Tejedo *et al.*, 2010), impondo o aceleração das taxas de desenvolvimento à custa do crescimento, de modo à metamorfose ocorrer antes de o charco secar (Denver, 1997; Newman, 1989), resultando em recém-metamorfoseados mais pequenos e podendo haver implicações na *fitness* do juvenil e do adulto resultantes (Smith, 1987). Por outro lado, o declínio de populações de anfíbios tem sido correlacionado com eventos climáticos. Estes eventos extremos podem influenciar, indirectamente, o começo da época de reprodução, a facilitação de propagação de epidemias, etc., e portanto, terão impacto ao nível da sobrevivência dos anfíbios globalmente (Carey e Alexander, 2003). Nos últimos anos tem se verificado o desaparecimento de muitas espécies de anfíbios a um ritmo elevado (Stuart *et al.*, 2003). Uma melhor compreensão sobre o efeito conjunto da temperatura e da dieta dos girinos irá beneficiar os programas de conservação relacionados com reprodução, os quais poderão ser a última hipótese para muitas espécies de anfíbios que se encontram em declínio (Mendelson *et al.*, 2006). Os resultados presentes neste estudo mostraram que esta espécie não se encontra adaptada à ocorrência de ondas de calor, pondo em risco a sobrevivência dos girinos e consequentemente dos recém-metamorfoseados, tendo implicações no futuro recrutamento e na estabilidade da população. Sendo esta uma espécie endémica da Península Ibérica, que se encontra classificada como quase ameaçada (Cabral *et al.*, 2005), no futuro poderão ser necessárias medidas de conservação mais fortes. Outra vantagem deste estudo foi mostrar como dois factores abióticos influenciam a metamorfose de *D. galganoi*, possibilitando a optimização das condições do meio em caso de conservação tanto ex-situ como in-situ.

Referências bibliográficas¹

- Abrams, P., Leimar, O., Nylin, S., Wiklund, C., 1996. The effect of flexible growth rates on optimal sizes and development times in a seasonal environment. *Am. Nat.* 147, 381-395.
- Alford, R., 1999. Ecology: resource use, competition, and predation. In: *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. Eds R.W. McDiarmid e R. Altig, pp. 240-278
- Altig, R., Whiles, M., Taylor, C., 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biology* 52, 386-395.
- Altwegg, R., Reyer, H., 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evol.* 57, 872–882.
- Álvarez, D., Nicieza, A., 2002a. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* 16, 640-648.
- Álvarez, D., Nicieza, A., 2002b. Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. *Oecologia* 131, 186-195.
- Angilletta, M., Steury, T., Sears, M., 2004. Temperature, growth, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* 44, 498–509.
- Arnold, S., Wassersug, R., 1978. Differential predation on metamorphic anurans by garter snakes (*Thamnophis*): social behavior as a possible defence. *Ecol.* 59, 1014-1022.
- Atkinson, D., 1994. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25, 1-58.
- Atkinson, D., Sibly, R., 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends in Ecology & Evolution* 12, 235–239.
- Beiswenger, R., 1977. Diel patterns of aggregative behaviour in tadpoles of *Bufo americanus*, in relation to light and temperature. *Ecol.* 58, 98-108.
- Bernal, S., Von Schiller, D., Sabater, F., Martí, E., 2013. Hydrological extremes modulate nutrient dynamics in Mediterranean climate streams across different spatial scales. *Hydrobiologia* 719, 31-42.
- Bonada, N., Resh, V., 2013. Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* 719, 1-29.
- Blouin, M., Loeb, M., 1991. Effects of environmentally induced development rate variation on head and limb morphology in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Am. Nat.* 138, 717-728.
- Blouin, M., Brown, S., 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia* 125, 358-361.
- Burton, T.M., Likens, G.E., 1975. Salamander populations and biomass in the Hubbard Brook experimental forest, New Hampshire. *Copeia* 1975, 541–546.

- Cabral, M., Almeida, J., Almeida, P., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M., Palmeirim, J., Queirós, A., Rogado, L., Santos-Reis, M., 2005. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza
- Canha, P., Pinto, C., 2010. Plano de Gestão de Charcos Temporários Mediterrânicos no Concelho de Odemira. Edição do Autor
- Cabrera-Guzmán, E., Crossland, M., Brown, G., Shine, R., 2013. Larger Body Size at Metamorphosis Enhances Survival, Growth and Performance of Young Cane Toads (*Rhinella marina*). PLoS ONE 8, 70121.
- Calef, G., 1973. Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. Ecol. 54, 741-758.
- Carey, C., Alexander, M., 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? J. Conserv. Biogeog. 9, 111-121.
- Castañeda, L., Sabat, P., Gonzalez, S., Nespolo, R., 2006. Digestive plasticity in tadpoles of the Chilean Giant Frog (*Caudiverberacuadiverbera*). Factorial effects of diet and temperature. Physiological and Biochemical Zoology 79, 919–926.
- Collins, J., 1979. Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. Ecol. 60, 738-749.
- Cook, S., Eubanks, M., Gold, R., Behmer, S., 2011. Seasonality Directs Contrasting Food Collection Behavior and Nutrient Regulation Strategies in Ants. PLoS ONE 6, 25407.
- Crump, M., 1990. Possible enhancement of growth in tadpoles through cannibalism. Copeia 1990, 560-564.
- Denver, R., 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. Am. Zool. 37, 172-184.
- Diaz-Paniagua, C. 1992. Variability in timing of larval season in an amphibian community in SW Spain. Ecography 15, 267-272.
- Dokulil, M., Teubner, K., Jagsch, A., Nickus, U., Adrian, R., Straile, D., Jankowski, T., Herzig, A., Padisák, J., 2010. The Impact of Climate Change on Lakes in Central Europe. Chapter 20, pp. 387-409. Aquatic Ecology Series.
- Downie, J., Bryce, R., Smith, J., 2004. Metamorphic duration: an under-studied variable in frog life histories. Biol. J. Linn. Soc. 83, 261-272.
- Easterling, D., Meehl, G., Parmesan, C., Changnon, S., Karl, T., Mearns, L., 2000. Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. Sci. 289, 2068-2074.
- Emerson, S., 1978. Allometry and jumping in frogs: helping the Twain to meet. Evol. 32, 551-564.
- Emerson, S., 1986. Heterochrony and frogs: the relationship of a life history trait to morphological form. Am. Nat. 127, 167-183.
- Escoriza, D., Boix, D., 2014. Reproductive habitat selection in alien and native populations of the genus *Discoglossus*. Hydrobiologia 59, 97-103.

- Evans-White, M., Dodds, W., Whiles, M., 2003. Ecosystem significance of crayfishes and stonerollers in a prairie stream: functional differences between co-occurring omnivores. *Journal of the North American Benthological Society* 22, 423-441.
- Ferrand de Almeida, N., Ferrand de Almeida, P., Gonçalves, H., Sequeira, F., Teixeira, J., Ferrand de Almeida, F., 2001. Guia FAPAS Anfíbios e Répteis de Portugal – Porto: FAPAS e Cam. Mun. do Porto
- García-París, M., Montori, A., Herrero, P., 2004. Fauna Iberica: Amphibia, Lissamphibia. Volume 24. Consejo superior de Investigaciones Científicas
- Gibbons, J.W., Winne, C.T., Scott, D.E., Willson, J.D., Glaudas, X., Andrews, K.M., Todd, B.D., Fedewa, L.A., Wilkinson, L., Tsaliagos, R.N., Harper, S.J., Greene, J.L., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Dorcast, M.E., Nestor, J.P., Young, C.A., Akre, T., Reed, R.N., Buhlmann, K.A., Norman, J., Croshaw, D.A., Hagen, C., Rothermel, B.B., 2006. Remarkable amphibian biomass and abundance in an isolated wetland: implications for wetland conservation. *Conserv. Biol.* 20, 1457–1465.
- Gomez-Mestre, I., Buchholz, D., 2006. Developmental plasticity mirrors differences among taxa in spadefoot toads linking plasticity and diversity. *The National Academy of Sciences of the USA* 50, 19021-19026.
- Gosner, K., 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetol.* 16, 183-190.
- Grillas, P., Gauthier, P., Yavercovski, N., Perennou, C., 2004. Mediterranean Temporary Pools. Volume 1: Issues relating to conservation, functioning and management. Edição dos autores
- Hamer, A., McDonnell, M., 2008. Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biol. Conserv.* 141, 2432-2449.
- Heinen, J., Abdella, J., 2005. On the advantages of putative cannibalism in American toad tadpoles (*Bufo a. americanus*): is it active or passive and why? *American Midland Naturalist* 153, 338-347.
- Hemelaar, A., 1988. Age, growth and other population characteristics of *Bufo bufo* from different latitudes and altitudes. *J. Herpetol.* 22, 369–388.
- Hensley, F., 1993. Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age of metamorphosis in tadpoles. *Ecol.* 74, 2405-2412.
- Horiuchi, S., Koshida, Y., 1989. Effects of foodstuffs on intestinal length in larvae of *Rhacophorus arboreus* (Anura: Rhacophoridae). *Zool. Sci.* 6, 321-328.
- IPCC, 2007. Climate change 2007: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge
- Janzen, F., 1993. An experimental analysis of natural selection on body size of hatchling turtles. *Ecol.* 74, 332-341.

- Jentsch, A., Kreyling, J., Beierkuhnlein, C., 2007. A new generation of climate change experiments: events, not trends. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5, 365–374.
- John-Alder, H., Morin, P., 1990. Effects of larval density on jumping ability and stamina in newly metamorphosed *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* 1990, 856-860.
- Kollros, J., 1961. Mechanisms of amphibian metamorphosis: hormones. *Am. Zool.* 1, 107-114
- Kupferberg, S., Marks, J., Power, M., 1994. Effects of variation in natural algal and detrital diets on larval anuran (*Hyla regilla*) life-history traits. *Copeia* 1994, 446-457
- Kupferberg, S., 1997. The role of larval diet in anuran metamorphosis. *Am. Zool.* 37, 146-159
- Licht, L., 1975. Comparative life history features of the western spotted frog, *Rana pretiosa*, from low- and high-elevation populations. *Can. J. Zool.* 53, 1254–1258.
- Liess, A., Rowe, O., Guo, J., Thomsson, G., Lind, M., 2013. Hot tadpoles from cold environments need more nutrients – life history and stoichiometry reflects latitudinal adaptation. *J. Anim. Ecol.* 1111, 1365-2656.
- Lindgren, b., Laurula, A., 2005. Proximate causes of adaptive growth rates: growth efficiency variation among latitudinal populations of *Rana temporaria*. *J. Evol. Biol.* 18, 820–828
- Martins, F., Mar Oom, M., Rebelo, R., Rosa, G., 2013. Differential Effects of Dietary Protein on Early Life-History and Morphological Traits in Natterjack Toad (*Epidalea Calamita*) Tadpoles Reared in Captivity. *Zoo. Biol.* 32, 457-432.
- Martínez-Solano, Í., 2004. Phylogeography of Iberian Discoglossus (Anura: Discoglossidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42, 298-305.
- McMenamin, S., Hadly, E., Wright, C., 2008. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *The National Academy of Sciences of the USA* 105, 16988-16993.
- Meehl, G., Tebaldi, C., 2004. More Intense, More Frequent, and Longer Lasting Heat Waves in the 21st Century. *Sci.* 305, 994-997.
- Mendelson, J., Lips, K., Gagliardo, R., Rabb, G., Collins, J., Diffendorfer, J., Daszak, P., Ibáñez, R., Zippel, K., Lawson, D., Wright, K., Stuart, S., Gascon, C., Silva, H., Burrowes, P., *et al.*, 2006. Biodiversity – confronting amphibian declines and extinctions. *Sci.* 313, 1541.
- Mitchell, N., Seymour, R., 2000. Effects of Temperature on Energy Cost and Timing of Embryonic and Larval Development of the Terrestrially Breeding Moss Frog, *Bryobatrachus nimbus*. *Physiological and Biochemical Zoology* 73, 829-840.
- Morrison, C., Hero, JM., 2003. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *J. Anim. Ecol.* 72, 270–279.
- Nathan, J., James, V., 1972. The role of Protozoa in the nutrition of tadpoles. *Copeia* 1972, 669-679.
- Newman, R., 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecol.* 70, 1775-1787.

- Nicieza, A., 2000. Interacting effects of predation risk and food availability on larval anuran behaviour and development. *Oecologia* 123, 489-505.
- Nicieza, A., Álvarez, D., Atienza, E., 2006. Delayed effects of larval predation risk and food quality on anuran juvenile performance. *Soc. Evol. Biol.* 19, 1092-1103.
- Orizaola, G., Laurila, A., 2009a. Microgeographic variation in the effects of larval temperature environment on juvenile morphology and locomotion in the pool frog. *J. Zool. (Lond)* 277, 267-274.
- Orizaola, G., Laurila, A., 2009b. Intraspecific variation of temperature-induced effects on metamorphosis in the pool frog (*Rana lessonae*). *J. Zool. (Can.)* 87, 581-588.
- Pandian, T., Marian, M., 1985a. Predicting anuran metamorphosis and energetics. *Physiol. Zool.* 58, 538-552.
- Pandian, T., Marian, M., 1985b. Time and energy cost of metamorphosis in the Indian Bullfrog *Rana tigrina*. *Copeia* 3, 653-662.
- Pereira, A., 2011. Biodiversidade de charcos temporários de diferentes idades na Serra de Grândola, Portugal. Dissertação de Mestrado em Biologia da Conservação
- Petranka, J., Kennedy, C., 1999. Pond tadpoles with generalized morphology: is it time to reconsider their functional roles in aquatic communities? *Oecologia* 120, 621-631.
- Pfennig, D., 1990. The adaptive significance of an environmentally-cued developmental switch in an anuran tadpole. *Oecologia* 85, 101-107.
- Pinto-Cruz, C., Molina, A., Barbour, M., Silva, V., Espírito-Santo, D., 2009. Plant communities as a tool in temporary ponds conservation in SW Portugal. *Hydrobiol.* 634, 11-24.
- Rebelo, R., Correia, A., Fonseca, F., Mathias, M., Santos-Reis, M., 2009. Herdade da Ribeira Abaixo e Serra de Grândola. Capítulo 18. *Ecossistemas e Bem-Estar Humano em Portugal*
- Richter-Boix, A., Llorente, G., Montori, A., 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evol. Ecol. Res.* 8, 309-320.
- Rose, C., 2005. Integrating ecology and developmental biology to explain the timing of frog metamorphosis. *Trend. Ecol. Evol.* 20, 129-135.
- Rowe, C., Dunson, W., 1995. Impacts of hydroperiod on growth and survival of larval amphibians in temporary ponds of Central Pennsylvania, USA. *Oecologia* 102, 397-403.
- Rubbo, M., Kiesecker, J., 2005. Amphibian breeding distribution in an urbanized landscape. *Conserv. Biol.* 19, 504-511.
- 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.
- Schiesari, L., Werner, E., Kling, G., 2009. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology* 54, 572-586.

- Scott, D., Casey, E., Donovan, M., Lynch, K., 2007. Amphibian lipid levels at metamorphosis correlate to post-metamorphic terrestrial survival. *Oecologia* 153: 521–532.
- Semlitsch R.D., D.E. Scott, and J.H.K Pechmann. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecol.* 69,184-192.
- Smith-Gill, S., Berven, K., 1979. Predicting amphibian metamorphosis. *Am. Nat.* 113, 563-585.
- Smith, D., 1987. Adult recruitment in chorus frogs. Effect of size and date at metamorphosis. *Ecol.* 68, 344-350.
- Stearns, S., 1992. The evolution of life-histories. Oxford: Oxford University Press.
- Steinwascher, K., Travis, J., 1983. Influence of Food Quality and Quantity on Early Larval Growth of Two Anurans. *Copeia* 1983, 238-242.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D., Waller, R., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Sci.* 306, 1783-1785.
- Tejedo, M., Marangoni, F., Pertoldi, C., Richter-Boix, A., Laurila, A., Orizaola, G., Nicieza, A., Álvarez, D., Gomez-Mestre, I., 2010. Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post-metamorphic frogs. *Climate Research* 43, 31-39.
- Tracy, C., Christian, K., O'Connor, M., Tracy, C., 1993. Behavioral thermoregulation by *Bufo americanus*: the importance of the hydric environment. *Herpetologic* 49, 375-382.
- Trigal, C., García-Criado, F., Camino-Fernández, A., 2007. Macroinvertebrate communities of mediterranean ponds (North Iberian Plateau): importance of natural and human-induced variability. *Freshwater Biology* 52, 2042-2055.
- Underwood, A., 1997. Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press
- Van Buskirk, J., Saxer, G., 2001. Delayed costs of an inducible defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evol.* 55, 821-829.
- Van der Have, T., Jong, G., 1996. Adult size in ectotherms: Temperature effects on growth and differentiation. *J. Theor. Biol* 183, 329-340.
- Vitt, L., Caldwell, J., 2009. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. 3ª edição. Elsevier
- Walsh, P., Downie, J., Monaghan, P., 2008a. Plasticity in the duration of metamorphosis in the African clawed toad. *J. Zool. (Lond)* 274, 143-149.
- Walsh, P., Downie, J., Monaghan, P., 2008b. Temperature-mediated morphology changes during metamorphic climax in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *J. Therm. Biol.* 33, 244-249.
- Walton, M., 1988. Relationships among metabolic, locomotory, and field measures of organismal performance in the Fowler's toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Physiol. Zool.* 61, 107-118.

- Wassersug, R., Sperry, D., 1977. The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura:Hylidae). *Ecol.* 58, 830-839.
- Wassersug, R., Hoff, K., 1979. A comparative study of the buccal pumping mechanism of tadpoles. *Biological Journal of the Linnean Society* 12, 225–259.
- Watkins, T., 2001. A quantitative genetic test of adaptive decoupling across metamorphosis for locomotor and life-history traits in the Pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Evol.* 55, 1668-1677.
- Wellborn, G., Skelly, D., Werner, E., 1996. Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 337–363.
- Werner, E., Skelly, D., Relyea, R., Yurewicz, K., 2007. Amphibian species richness across environmental gradients. *Oikos* 116, 1697–1712.
- Whiles, M., Lips, K., Pringle, C., Kilham, S., Bixby, R., Connelly R., Colon-Gaud, J., Hunte-Brown, M., Huryn, A., Montgomery, C., Peterson, S., 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4, 27–34.
- White, B., Nicoll, S., 1981. Hormonal control of amphibian metamorphosis. *Metamorphosis* (eds L.I. Gilbert & E. Frieden), pp. 363–396. Plenum Press, New York.
- Wilbur, H., Collins, J., 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Sci.* 182, 1305-1314.
- Wilbur, H., 1980. Complex life cycles. *Annual review of Ecology and Systematics.* 11, 67-93.
- Wollmuth, L., Crawshaw, L., Forbes, R., Grahn, D., 1987. Temperature selection during development in a montane anuran species, *Rana cascadae*. *Physiol. Zool.* 60, 472-480.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com as normas propostas pela Biological Conservation.