

SISTEMES I PROCESSOS

Interrupció i creixement en la hibernació del gripau corredor (*Epidalea calamita*) en zones semiàrides

Delfí Sanuy*, Neus Oromí*, Ricard Blanco* & Ulrich Sinsch**

Rebut: 14.11.05
Acceptat: 29.09.06

Resum

Les particularitats de les poblacions amfibiques que viuen en zones semiàrides sotmeses a un alt estrès ambiental es posen de manifest mitjançant estudis d'esqueletocronologia. L'estudi pretén avaluar la correlació histològica entre les marques de creixement (*lines of arrested growth* [LAG]) que es visualitzen en les falanges dels dits i l'edat d'individus de gripau corredor (*Epidalea calamita*). Existeix una correspondència entre el nombre de LAG i el nombre d'hibernacions, de manera que, en un principi, s'entén cada una de les línies com un any de vida de l'individu. En els resultats trobats mitjançant l'anàlisi dels talls de les falanges, s'aprecien un conjunt de línies múltiples que es consideren com una hibernació interrompuda per petits creixements durant els períodes més càlids de l'hivern i en certa part també per les ocasionals precipitacions. Els resultats obtinguts suggereixen l'existència d'un patró de creixement, en les poblacions d'amfibis en zones semiàrides, diferent de qualsevol altre trobat en amfibis de zones temperades.

MOTS CLAU: esqueletocronologia, zones semiàrides, *Epidalea calamita*.

* Escola Superior d'Enginyeria Agrària. Departament de Producció Animal (Fauna Silvestre). Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure, 177. 25188 Lleida.
A/e: dsanuy@rodan.udl.es

** Institut für Biologie. Universitat de Koblenz-Landau. Postfach 20 16 02, D-56016 Koblenz, Alemanya.
A/e: sinsch@uni-koblenz.de

Abstract

Growth during interruptions in the hibernation in the natterjack toad (*Epidalea calamita*) in semi-arid areas

The biology of amphibian populations in semi-arid zones that suffer environmental stress can be revealed through skeletochronological studies. These studies aim to determine the age of natterjack toads from the lines of arrested growth (LAG) that can be observed in the phalanges. There is a correspondence between the number of LAGs and the number of hibernation so that in principle one LAG means one year of life. In the analysis of the phalanges we found a group of multiples lines, which we considered to be the result of a hibernation interrupted by short phases of growth during warmer periods in winter and also to some extent by the occasional precipitation. The results obtained suggest a pattern of growth in amphibian populations in semi-arid zones that is different from any found in amphibian in temperate zones.

KEY WORDS: skeletochronology, semi-arid areas, *Epidalea calamita*.

Resumen

Interrupción y crecimiento en la hibernación del sapo corredor (*Epidalea calamita*) en zonas semiáridas

Las particularidades de las poblaciones de anfibios que viven en zonas semiáridas sometidas a un elevado estrés ambiental se ponen de manifiesto mediante estudios esqueletocronológicos. El estudio pretende evaluar la correlación histológica entre las marcas de crecimiento (*lines of arrested growth* [LAG]) visibles en las falanges de los dedos y la edad de individuos del sapo corredor (*Epidalea calamita*). Existe una correspondencia entre el número de LAG y el número de hibernaciones, de manera que, en principio, cada una de las líneas de crecimiento se traduce en un año de vida del individuo. En los resultados encontrados mediante el análisis de los cortes de las falanges, se puede apreciar un conjunto de líneas múltiples que se consideran como una hibernación interrumpida por pequeños crecimientos durante los períodos más cálidos del invierno y ocasionalmente por las precipitaciones. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un patrón de crecimiento, en las poblaciones de anfibios de zonas semiáridas, diferente a cualquier otro encontrado hasta el momento en anfibios de zonas templadas.

PALABRAS CLAVE: esqueletocronología, zonas semiáridas, *Epidalea calamita*.

Introducció

La biologia dels organismes es regeix per patrons de creixement, desenvolupament, capacitat de llurs reserves (*storage*) i reproducció (Begon *et al.*, 1996). En els amfibis, l'any d'arribada a la maduresa, la longevitat, el potencial reproductiu i la relació entre la mida i l'edat, entre d'altres, esdevenen trets de vida connectats pels anomenats *compromisos* (*trade-offs*) (Stearns, 1992, 2000). Les variacions de la biologia dels individus entre poblacions diferents d'anurs són sovint explicades per diferències en la qualitat de l'hàbitat així com per la latitud i altitud i el clima (revi-

sió de Morrison & Hero, 2003; *Bufo bufo* Hemelaar, 1988; *Rana temporaria* Ryser, 1996, Miaud *et al.*, 1999; *Rana sylvatica* Sagor *et al.* 1998; *Litoria spp.* Morrison *et al.*, 2004). A causa de la diferent inversió de l'energia per dur a terme la reproducció entre els diferents sexes, llur estructura d'edats també pot variar entre les poblacions (Charlesworth, 1980).

L'avaluació de la majoria d'aspectes demogràfics en les poblacions amfibiques requereix mètodes fiables amb la finalitat de determinar l'edat dels individus (Halliday & Verrell, 1988). L'esqueletocronologia esdevé un mètode emprat precís per a determinar l'edat dels amfibis en zones temperades (Smirina, 1972; Castanet *et al.*, 1993). La visualització de les línies o marques produïdes per l'aturada del creixement (LAG: *lines of arrested growth*) que es produeix durant la hibernació —o durant l'estivació, si aquesta es produeix— i el recompte del nombre de LAG en cada tipus d'os, per exemple, la falange del dit, permet estimar l'edat amb un estret marge d'error.

En el present estudi, s'han utilitzat mètodes esqueletocronològics per tal d'avaluar la correlació entre les marques de creixement (LAG) que es visualitzen en les falanges dels dits i l'edat d'una població de gripau corredor (*Epidalea calamita*) situada en l'espai natural de Mas de Melons —Lleida—. Aquesta zona presenta un ambient estèpic, amb un clima caracteritzat per un dèficit hídric, estius calorosos i hiverns freds. En aquests ambients s'ha desenvolupat una flora i fauna molt particulars, adaptades a aquestes dures condicions ambientals (Conesa *et al.*, 1994).

Són poc nombrosos els treballs efectuats sobre amfibis en zones semiàrides, (Miaud *et al.*, 2000; Miaud & Sanuy, 2005). Els amfibis varen ser els primers vertebrats a conquerir el medi terrestre i per tant els primers que varen adoptar tota una sèrie d'adaptacions (morfològiques, fisiològiques i comportamentals)

44 mascles i 4 femelles (21-23/04/04). La variació en el nombre d'individus per sexe es deu al fet que el mostreig es va realitzar a l'atzar per tal de representar la població reproductiva local. Els individus varen ser sexats i mesurats (longitud corporal) i es va procedir a seccionar el tercer dit de la mà dreta de cada un dels gripaus. Tot seguit, els animals van ser alliberats *in situ*.

El protocol emprat en el laboratori es basa en el mètode d'esqueletocronologia descrit per Smirina (1972) i Kuhn (1994). Després d'ésser descalcificades, les mostres varen ser incloses en HistoresinTMJUNG i tenyides amb cresil de violeta (més detalls en Sinsch *et al.*, 2001). Es varen realitzar seccions de 10 µm de les falanges mitjançant un micròtom rotador JUNG RM2055. Les seccions varen ser examinades amb microscopi i maximitzades mitjançant fotografies digitals. Les observacions de les LAG de les seccions es varen realitzar en la zona de la diàfisi on la cavitat medul·lar és mínima.

Les variables obtingudes varen ser el sexe, l'any (com a nombre d'hibernacions) i el nombre de LAG per hibernació en cinc hiverns consecutius (1999-2000, 2000-2001, 2002-2003, 2003-2004).

Recull climàtic

Les dades de microclima local (1999-2004) varen ser obtingudes de l'estació meteorològica de Castellldans (41,53° N, 0,754° E; 225 masl), a 1 km del lloc de recollida de les mostres. A causa del fet que l'activitat dels gripaus es veu influenciada bàsicament per variables de temperatura i humitat, es varen recollir les dades de 7 variables: 1) temperatura mitjana diària, 2) temperatura màxima diària, 3) temperatura mínima, diària, 4) nombre de dies per mes amb temperatures inferiors a zero, 5) nombre de dies per mes amb precipitacions, 6) precipitació mensual (mm), i 7) evapotranspiració.

Anàlisi estadística

Els efectes potencials del sexe, l'edat i l'any en el nombre de línies d'aturada de creixement considerades per hivern varen ser estimats mitjançant una anàlisi de la variància (ANOVA) amb quatre factors sense interacció.

Es va utilitzar la regressió lineal múltiple per tal de posar a punt un model predictiu per al nombre de LAG per hivern basat en les set variables meteorològiques recollides.

En totes les anàlisis, el nivell de significació va ésser del 0,05 i el programa utilitzat, STATGRAPHICS Plus per a Windows, versió 5.0.

Resultats i discussió

Determinació de l'edat dels individus

Períodes de creixement a l'estiu i a l'hivern

El nombre de LAG per gripau es va situar entre 3 i 10. Tanmateix, es va poder distingir un grup de gripaus amb més de 4 línies que presentaven una àrea de creixement circular entre dues línies molt petites. En els individus que no pertanyien a aquest grup de línies múltiples, l'àrea de creixement entre LAG decreixia exponencialment del primer a l'últim any (exemple: figures 2A, C, E). En contraposició, no es va poder distingir un patró regular de creixement de l'àrea de l'os en els individus amb múltiples línies (exemple: figures 2B, D, F). Es varen considerar els grups de línies múltiples com una hibernació interrompuda per petits creixements durant els períodes més càlids de l'hivern.

Els criteris d'assignació del creixement entre els períodes d'hivern i de primavera-estiu es basen en una comparació entre àrees de creixement: si l'àrea compresa entre l'última línia de creixement i la línia múltipla avaluada era major que l'àrea compresa entre la línia que es volia avaluar i l'anterior, s'assignava

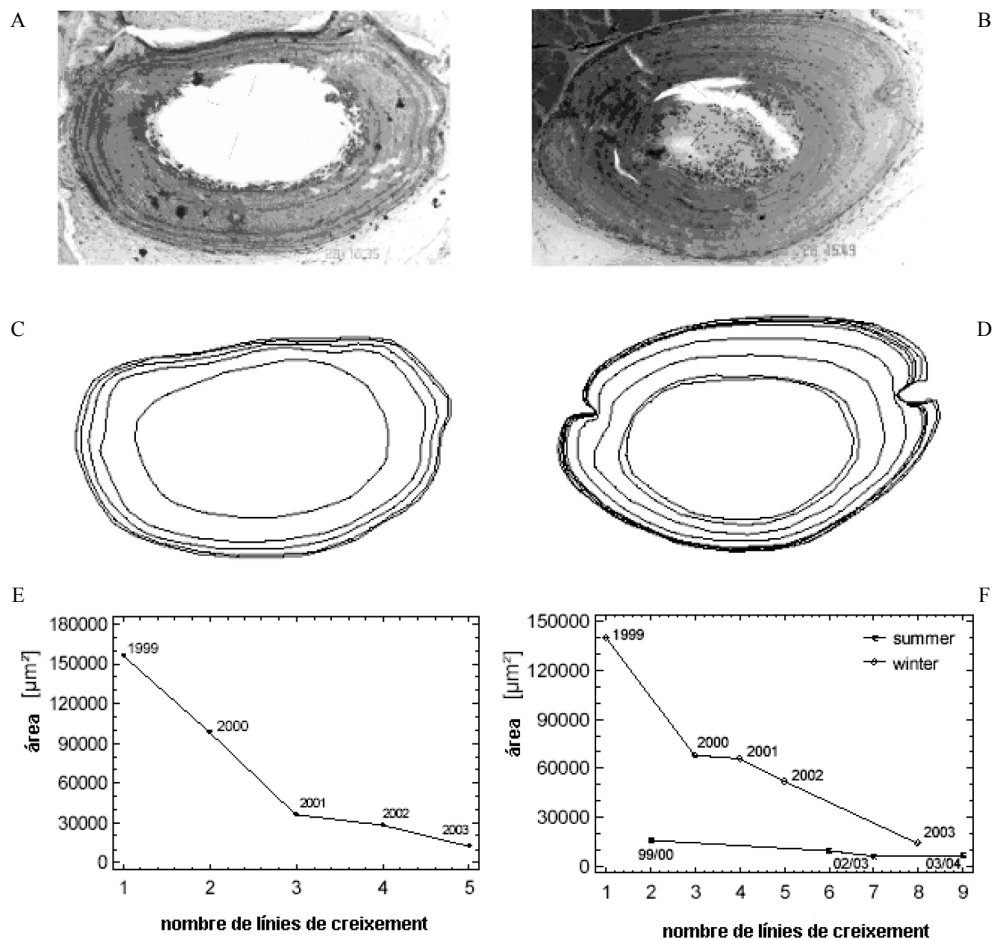


FIGURA 2. Distinció entre marques de creixement estivals i hivernals. (A), (C) i (E): mascle 67; (B), (D) i (F): mascle 92, Mas de Melons; (A, B): imatge digital de la secció de la diàfisi; (C, D): representació de les línies d'aturada de creixement utilitzades per mesurar l'àrea circumdant, i (E, F): àrea dels períodes successius de creixement; cada àrea de creixement és considerada un any.

un hivern. Aquest criteri es basa en les següents consideracions acceptades per la literatura científica (per exemple, Castanet *et al.*, 1993):

- la taxa de creixement disminueix amb l'edat;

- a partir de l'arribada a la maduresa de creix el creixement;

- s'espera que el creixement durant la primavera-estiu (6 mesos) sigui major que durant els períodes càlids de l'hivern (2-3 setmanes).

En la majoria de casos, es va poder distingir entre el creixement a l'hivern i a l'estiu (el 95 % correspon a assignacions quantitatives i qualitatives).

Factors que afecten el nombre de línies per hivern

El nombre de línies (LAG) durant el període d'hivernació es va estimar entre 1 i 4, és a

TAULA 1. Components de l'ANOVA de quatre factors sobre el nombre de línies per hibernació. Edat: nombre d'hibernacions abans de l'hivern del 2005.

	Suma dels quadrats	GL	Mitjana dels quadrats	Valor F	Probabilitat
Efectes					
Sexe	0,001	1	0,001	0,00	P > 0,05
Edat	8,193	5	1,639	3,17	P = 0,0083
Any	30,771	4	7,693	14,87	P < 0,0001
Residual	164,457	318	0,518		
Total	203,422	328			

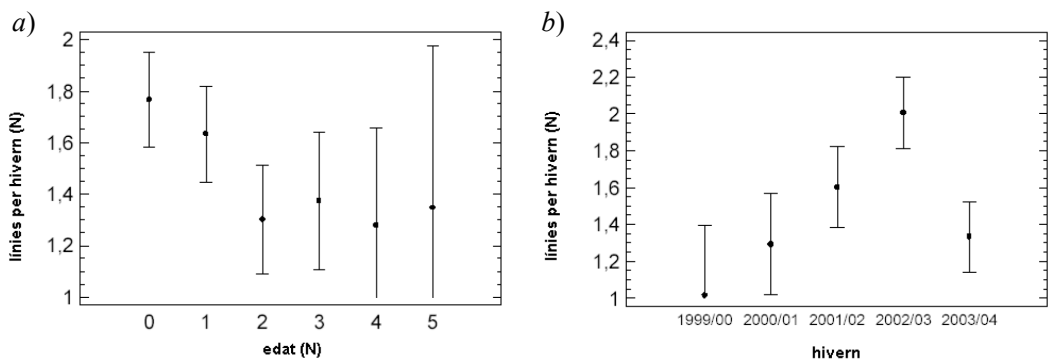


FIGURA 3. Variació deguda a l'any d'hibernació (a) i entre 5 hiverns successius (b) de la freqüència de línies múltiples. L'anàlisi estadística corresponent (ANOVA) es recull a la taula 1.

dir, la hibernació va ser interrompuda per tres curts períodes de creixement. L'anàlisi multifactorial ANOVA realitzat per les variables independents, sexe, edat i any mostrava que tan sols el sexe no afectava la quantitat de línies múltiples (taula 1).

A la figura 3a es pot observar que, quan l'any d'hibernació corresponia a individus joves (menors de dos anys), el nombre mitjà de línies per hibernació era d'1,6-1,8, considerablement més gran que el corresponent a l'estat adult (1,3). Aquests resultats sembla que indiquen una variació en el comportament hivernal entre adults i joves. Els individus més joves podrien abandonar amb més freqüència llur hibernació i presentar una activitat vital diferent que es reflectiria en les línies de creixement de l'os. En l'estudi realitzat per Leskovar *et al.* (2006) en la mateixa població de gripaus, es constata que els individus arri-

baven a la seva mida més gran durant els dos primers anys de vida. La presència de major activitat en els joves durant l'hivern i la inversió de tota la seva energia en el creixement, car encara no són reproductius, es traduiria en un major augment de la seva massa corporal. La mida dels individus es correlaciona amb la *fitness*; per tant, els individus maximitzen la seva taxa de creixement juvenil per tal d'aconseguir la major mida en un període de temps curt. L'estudi del creixement en juvenils és un factor principal per a entendre l'evolució general de la biologia dels animals ectotèrmes (Gotthard, 2001).

Les dades aportades pels individus de 5 anys varen permetre analitzar 5 períodes d'hibernació, compresos entre el 1999-2000 i el 2003-2004. En la figura 3b s'observa que existeixen diferències en el nombre de línies d'aturada de creixement en els diferents anys.

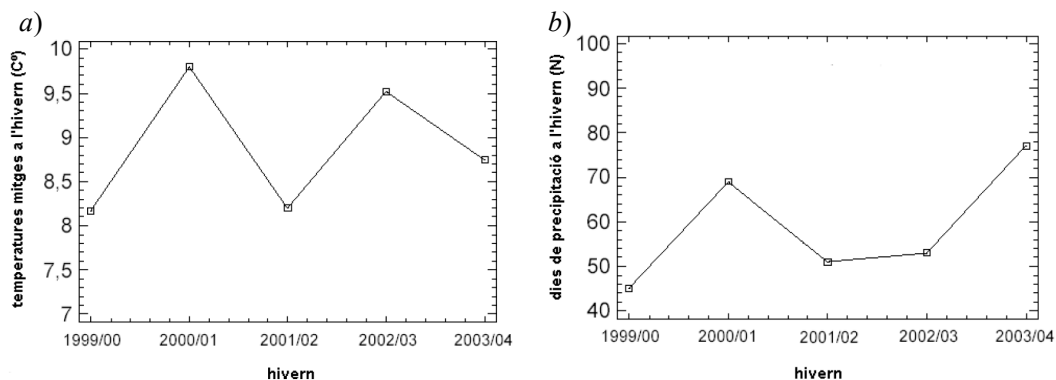


FIGURA 4. Variables meteorològiques locals durant l'hivern (període comprès entre l'octubre i el març de l'any següent: a) temperatura mitjana anual, i b) nombre de dies amb precipitació.

TAULA 2. Anàlisi multifactorial de les variables que afecten potencialment el nombre de línies produïdes per hibernació: a) model de regressió, R^2 (ajustat per GL) = 88,2 %; b) ANOVA.

a)

	Estimada +/-SE	Valor T	Probabilitat
Efectes			
Constant	-4,01+/-1,21	-3,32	P = 0,0295
Dies gelada (nre.)	0,02+/-0,01	2,50	P = 0,0671
Temperatura màx. (°C)	1,69+/-0,34	5,06	P = 0,0072
Temperatura mín. (°C)	2,85+/-0,54	5,24	P = 0,0063
Mitjana temperatures (°C)	-3,36+/-0,71	-4,48	P = 0,0090
Precipitació (mm)	-0,005+/-0,001	-4,78	P = 0,0088

b)

	Suma de quadrats	GL	Mitjana de quadrats	Valor F	Probabilitat
Model	0,948	5	0,190	14,45	P = 0,0114
Residual	0,053	4	0,013		
Total	1,001	9			

El clima local durant l'hivern va variar respecte a la temperatura i la precipitació (figura 4). L'anàlisi mitjançant regressió múltipla va permetre constatar la hipòtesi que la variació de les LAG per períodes d'hibernació corresponia a la variació del clima local. En la taula 2 s'observen les variables que varen afectar significativament la producció de línies i que finalment varen formar el model estadístic emprat que explica el 88,2 % de la variabilitat. Aques-

tes variables eren principalment temperatura i precipitació. Es constata, per tant, l'existència d'una relació entre la temperatura i la precipitació en l'abandonament de la hibernació.

Durant el pas de les últimes dècades d'estudis esqueletocronològics, la presència de «dobles» o «múltiples» línies s'ha considerat un fenomen ocasional, enigmàtic i anormal en el patró de creixement dels amfibis, ja que les zones on s'havien estudiat presentaven un

cicle d'estacions anuals molt marcat amb hiverns freds i humits (zones temperades: Smirina, 1994) o estius calorosos i secs (zones subtropicals: Morrison *et al.*, 2004). Les anàlisis realitzades suggereixen que, a les zones semiàrides, l'existència de períodes amb temperatures càlides a l'hivern permet interrompre la hibernació del gripau corredor, cosa que es tradueix en petits períodes de creixement. Aquest fet evidencia que la freqüència de múltiples marques de creixement trobades en aquestes poblacions no és una aberració en el patró de creixement considerat pels amfibis, sinó que correspon a una informació histològica correlacionada amb els impactes locals ambientals.

En conclusió, els resultats obtinguts suggereixen que les poblacions de gripau corredor en zones semiàrides presenten un patró de creixement diferent de qualsevol altre trobat en poblacions d'amfibis de zones temperades. Aquest patró de creixement poc comú pot ésser explicat per la climatologia caracteritzada principalment per minses precipitacions i períodes amb elevades temperatures a l'estiu. Es constata, per tant, la importància de l'estudi de les zones àrides per tal d'entendre la biologia d'aquestes espècies amfibies però colonitzadores del medi terrestre.

Bibliografia

- BEGON, M.; HARPER, J. L. & TOWNSEND, C. R. 1996. *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- CASTANET, J.; FRANCILLON-VIEILLOT, H.; MEUNIER, F. J. & RICQLÈS, A. DE 1993. Bone and individual aging. In: *Hall BK (ed) Bone growth*. Vol. 7. CRC Press. Boca Raton. p. 245-283.
- CHARLESWORTH, B. 1980. Evolution in age-structured populations. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- CONESA, J. A.; MAYORAL, A.; PEDRO, J. & RECASENS, J. 1994. *El paisatge vegetal dels espais d'interès natural de Lleida: area meridional*. IEI. Diputació de Lleida.
- GOTTHARD, K. 2001. Growth strategies of ectothermic animals in temperate environments. *Animal Developmental Ecology*. (Chapter 15). Edited by Atkinson D. & Thorndyke M. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford.
- HALLIDAY, T. R. & VERRELL, P. A. 1988. Body size and age in amphibians and reptiles. *J. Herpetology*, 22: 253-265
- HEMELAAR, A. M. S. 1988. Age, growth and other population characteristics of *Bufo bufo* from different latitudes and altitudes. *J. Herpetology*, 22: 369-388
- KUHN, J. 1994. Lebensgeschichte und Demographie von Erdkrötenweibchen *Bufo bufo bufo* (L.). *Z. Feldherpetologie*, 1: 3-87.
- LESKOVAR, C.; OROMÍ, N.; SANUY, D. & SINSCH, U. 2006. Demographic life history traits of reproductive natterjack toads (*Bufo calamita*) vary between northern and southern latitudes. *Amphibia-Reptilia*. En premsa.
- MIAUD, C.; GUYETANT, R. & ELMBERG, J. 1999. Variations in life-history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia : Anura): a literature review and new data from the French Alps. *J. Zoology (London)*, 249: 61-73
- MIAUD, C. & SANUY, D. 2005. Terrestrial habitat preferences of the natterjack toad during and after the breeding season in a landscape of intensive agricultural activity. *Amphibia-Reptilia*, 26(3): 359-366.
- MIAUD, C.; SANUY, D. & AVRILLIER, J. N. 2000. Terrestrial movements of the natterjack toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia*, 21(3): 357-369.
- MORRISON, C. & HERO, J. M. 2003. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *J Animal Ecology*, 72: 270-279.
- MORRISON, C.; HERO, J. M. & BROWNING, J. 2004. Altitudinal variation in the age at maturity, longevity, and reproductive lifespan of anurans in subtropical Queensland. *Herpetologica*, 60(1): 34-44.
- RYSER, J. 1996. Comparative life histories of a low- and a high-elevation population of the common frog *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia*, 17(3):183-196.
- SAGOR, E. S.; OUELLET, M.; BARTEN, E. & GREEN, D. M. 1998. Skeletochronology and geographic variation in age structure in the wood frog, *Rana sylvatica*. *J. Herpetology*, 32(4): 469-474.
- SINSCH, U. 1997. Postmetamorphic dispersal and recruitment of first breeders in a *Bufo calamita*-metapopulation. *Oecologia*, 112: 42-47.
- SINSCH, U.; DI TADA, I. E. & MARTINO, A. 2001. Longevity, demography and sex-specific growth of the Pampa de Achala Toad, *Bufo achalensis* CEI, 1972. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.*, 36(2): 95-104.
- SMIRINA, E. M. 1972. Annual layers in bones of *Rana temporaria*. *Zool. Zh.*, 51: 1529-1534.
- SMIRINA, E. M. 1994. Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology*, 40: 133-146.
- STEARNS, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press. Londres. p. 123-211.
- STEARNS, S. C. 2000. Life history evolution: successes, limitations and prospects. *Naturwissenschaften*, 87: 476-486.
- TEJEDO, M.; REQUES, R. & ESTEBAN, M. 1997. Actual and osteochronological estimated age of natterjack toads (*Bufo calamita*). *Herpetological J.*, 7: 81-82.