



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE**

ARTHUR GOMES BAUER

**EFEITO DO AUMENTO DA TEMPERATURA DA ÁGUA E DO
ESTRESSE HÍDRICO NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO,
DESENVOLVIMENTO E ASSIMETRIA FLUTUANTE EM
GIRINOS DE *DENDROPSOPHUS MINUTUS* (ANURA: HYLIDAE)**

ILHÉUS/BA

FEVEREIRO/2018

B344

Bauer, Arthur Gomes.

Efeito do aumento da temperatura da água e do estresse hídrico na sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e assimetria flutuante em girinos de *Dendropsophus minutus* (Anura: hylidae). / Arthur Gomes Bauer – Ilhéus, BA: UESC, 2018.

30f. : il.

Orientador: Mirco Solé

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Inclui referências.

1. Anfíbios. 2. Mudanças climáticas – Aspectos ambientais. 3. Efeitos da temperatura. 4. Mortalidade. 5. Stress (Fisiologia). 6. Evolução (Biologia). 7. Ecossistemas. I. Título.

CDD 597.8

ARTHUR GOMES BAUER

**EFEITO DO AUMENTO DA TEMPERATURA DA ÁGUA E DO
ESTRESSE HÍDRICO NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO,
DESENVOLVIMENTO E ASSIMETRIA FLUTUANTE EM GIRINOS
DE *DENDROPSOPHUS MINUTUS* (ANURA: HYLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ecologia e Conservação
da Biodiversidade da Universidade Estadual
de Santa Cruz para obtenção do título de
Mestre em Ecologia e Conservação da
Biodiversidade

Orientador: Prof. Dr. Mirco Solé

ILHÉUS/BA

FEVEREIRO/2018

ARTHUR GOMES BAUER

EFEITO DO AUMENTO DA TEMPERATURA DA ÁGUA E DO ESTRESSE HÍDRICO NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E ASSIMETRIA FLUTUANTE EM GIRINOS DE *DENDROPSOPHUS MINUTUS* (ANURA: HYLIDAE)

Ilhéus, 28 de fevereiro de 2018

Dra. Núbia Carla Santos Marques

Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia - IPAM

Dr. Fausto Nomura

Universidade Federal de Goiás - UFG

Dr. Mirco Solé (orientador)

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

*“O segredo não é correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha família por todo apoio recebido. Obrigado pai, Galgal, mãe, irmão, Seba, vovó, tias e tios e primos. Amo todos e sem vocês eu nada poderia!

A todos os meus amigos, aqui presentes ou longe, agradeço pelos momentos bons e ruins. Chuva, barro, frio, Sol, calor, sorrisos, farras, curtição, chatices, enfim, agradeço meus caros. Obrigado por poder contar com vocês!!

A minha companheira Milena, pela paciência e incentivo. Obrigado minha branca, te amo!!

Por fim, agradeço a FAPESB pela bolsa de mestrado concedida, a Universidade Estadual de Santa Cruz e ao PPG Ecologia e Conservação da Biodiversidade, pelo apoio e confiança.

ÍNDICE

RESUMO

INTRODUÇÃO 2

MATERIAL E MÉTODOS 4

RESULTADOS 7

DISCUSSÃO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 15

TABELAS E FIGURAS 25

Abstract

Faced with the current biodiversity crisis that can be compared to a sixth event of mass extinction, studies that seek to understand how factors related to environmental changes from human activities are very important for conservation policies. The increase in temperature and water stress are associated with global warming and are some of the threats that contribute to the increase in the local and global extinction rates of the species. The increase in temperature and water stress associated with global warming are some of the threats that contribute to the increase in local and global species extinction rates, especially amphibians, which are very sensitive to environmental changes due to their intimate relationship with the habitat and climatic conditions such as temperature and humidity. We evaluated experimentally the impacts on mortality, growth, development and floating asymmetry of tadpoles of *D. minutus*, due to the increase of temperature and water stress. Experiments with mesocosms can help in understanding the real effects of climate change, since they present a degree of realism and facilitate the isolation of environmental variables. Our results showed higher mortality rates and lower body development levels in water heating treatments. The stages of development were not influenced by any factor that was submitted, remaining constant in all treatments, as well as levels of floating asymmetry, which did not present differences between treatments for any of the structures analyzed. High temperatures may be a considerable source of physiological stress on tadpoles, constituting possibly an important selection pressure, which has favored the adaptive evolution in its maximum thermal tolerances. The synergistic effects involved in global climate change are little known and appear to have a large effect on species persistence, and understanding the biological responses generated by such effects is a challenge for future studies related to environmental changes.

Key-words: Climate change, environmental impacts, amphibians, experiment and mesocosms.

Resumo

Frente à crise da biodiversidade atual que pode ser comparada a um sexto evento de extinção em massa, estudos que buscam a compreensão de como fatores relacionados às alterações ambientais advindas das atividades humanas são de total importância na tomada de decisões sobre conservação. O aumento da temperatura e o estresse hídrico associados ao aquecimento global, são algumas das ameaças que colaboram para o incremento nas taxas de extinções locais e globais das espécies. Os anfíbios são um grupo muito sensível às alterações ambientais devido a sua íntima relação com o habitat e com as condições climáticas como a temperatura e a umidade. Neste trabalho buscamos avaliar os impactos na mortalidade, crescimento, desenvolvimento e assimetria flutuante de girinos de *D. minutus*, em função do incremento de temperatura e do estresse hídrico. Experimentos com mesocosmos podem auxiliar no entendimento dos reais efeitos frente as mudanças climáticas, pois apresentam um grau de realismo e facilitam o isolamento de variáveis ambientais. Em nossos resultados obtivemos taxas de mortalidade maiores e níveis de desenvolvimento corporal menores nos tratamentos com aquecimento da água. Os estágios de desenvolvimento não tiveram influência de nenhum fator a qual foi submetido, se mantendo constantes em todos os tratamentos, assim como os níveis de assimetria flutuante, que não apresentaram diferenças entre os tratamentos para nenhuma das estruturas analisadas. Temperaturas elevadas podem ser uma fonte considerável de estresse fisiológico sobre girinos, constituindo possivelmente uma importante pressão de seleção, que tem favorecido a evolução adaptativa em suas tolerâncias térmicas máximas. Os efeitos sinérgicos envolvidos nas mudanças climáticas globais são poucos conhecidos e parecem ter um grande efeito na persistência das espécies, e o entendimento das respostas biológicas geradas por tais efeitos são um desafio para estudos futuros relacionados a alterações ambientais.

Palavras chave: Mudanças climáticas, impactos ambientais, anfíbios, experimento e mesocosmos.

Introdução

Não há dúvidas de que estamos passando por uma crise na biodiversidade mundial, com altos índices de extinções de espécies em um curto espaço de tempo, sendo tratado por diversos pesquisadores como um sexto evento de extinção em massa (Wake & Vredenburg, 2008; Barnorsky et al. 2011). A perda da quantidade e qualidade dos habitats e o aquecimento global, acelerado por fatores associados às ações antrópicas, afetam diretamente a sobrevivência e persistência dos organismos (Fonseca et al. 2008; IPCC 2014), onde as alterações nos fatores bióticos e abióticos do ecossistema resultam em mudanças na fenologia e distribuição geográfica de várias espécies (Parmesan & Yohe 2003).

Os diferentes tipos de estresse ambiental podem gerar diferentes tipos de respostas e consequências ecológicas aos ecossistemas naturais. O aumento da temperatura, a alteração e perda de habitats naturais, o aumento de gases poluentes e a variação no regime hídrico são algumas das alterações advindas das atividades humanas que podem ter efeitos na biologia das espécies e na estrutura, dinâmica e padrões de populações e comunidades (Sanseverino & Nessimian, 2008; Pereira et al., 2010). Dentre as principais ameaças a manutenção da biota, o impacto de uso das terras e a alteração do habitat darão lugar as mudanças climáticas como sendo a principal ameaça as tendências populacionais da biodiversidade (Lemoine et al., 2007), pois esta, deverá aumentar ao longo do tempo, afetando a temperatura e ocasionando mudanças na precipitação, fatores que são essenciais na determinação dos efeitos de perda e fragmentação de habitat (Mantyka-Pringle et al., 2011).

Os impactos ecológicos das mudanças climáticas na diversidade biológica podem atingir vários níveis tróficos, nas mais variadas formas e intensidade (Bellard et al., 2012). A primeira questão a ser debatida é se os organismos terão capacidade de se adaptar rápido o suficiente para acompanhar a velocidade das mudanças do clima, persistindo ao longo do tempo no “novo” ambiente (Lavergne et al., 2010; Salamin et al., 2010). Hoffman & Sgro (2011) sugerem que a capacidade de alterar suas necessidades fisiológicas e morfológicas (plasticidade fenotípica adaptativa), muitas das vezes é mais significativa do que a sua contribuição genética, quando se refere a impactos das alterações climáticas, pois essas mudanças requerem uma rápida resposta dos organismos sob pressão. Outra questão e de total importância é a de que, se os organismos persistirem

ao longo do tempo, quais serão suas respostas em relação as mudanças no clima e nas condições referentes ao habitat. Modificações nas relações inter-específicas, declínios populacionais e a redução da biodiversidade genética, por exemplo, modificam a estrutura da comunidade, altera a rede de interações, promovendo uma modificação no funcionamento do ecossistema e dos serviços ecossistêmicos (Lafferty 2009; Gilman et al., 2010; Walther, 2010; Yang & Rudolf, 2010). Bellard et al. (2012) afirma que a biodiversidade pode responder de várias maneiras, através de vários tipos de mecanismos. Por exemplo, estudos demonstram que, para os organismos ectotérmicos, a temperatura pode ser um dos fatores mais impactantes, afetando o desenvolvimento e crescimento destas espécies (Huey & Stevenson, 1979; Pandian & Marian, 1985b; Van der Have & Jong, 1996; Blouin & Brown, 2000; Orizaola & Laurila, 2009b).

O grupo dos anfíbios é um dos mais ameaçados, especialmente devido à alta sensibilidade associada às suas características fisiológicas, ecológicas e de história de vida que os tornam altamente suscetíveis ao aumento da temperatura global e das condições referentes a qualidade do habitat (Collins & Storfer 2003; Cushman, 2006; Dawson et al., 2011; Huey et al., 2012). Alterações neste âmbito podem afetar o fitness das espécies e conseqüentemente as interações intra e interespecíficas (*e.g.* predação, competição), podendo gerar mudanças nas dinâmicas populacionais e na estrutura das comunidades (Goldstein et al., 2017). O aumento da temperatura global reflete em alterações nas condições ambientais necessárias para a ocorrência e manutenção do modo de vida dos anfíbios, como por exemplo, a redução do volume d'água dos cursos hídricos (especialmente corpos d'água temporários), redução na disponibilidade de alimento, além da maior perda de água corpórea, podendo ter efeitos negativos sobre a taxas de sobrevivência, de aptidão competitiva e reprodutiva das espécies (Moore & Gatten, 1989). As larvas de anuros possuem uma alta plasticidade fenotípica e podem expressar diferentes fenótipos de acordo com as diferentes condições ambientais, como por exemplo, com o aumento da pressão de competição, predação e/ou em resposta às perturbações ambientais (Altig & McDiarmid, 1999a, b; Relyea, 2002; Miner et al., 2005). Devido a sua história de vida, os girinos permanecem por mais tempo nos ambientes reprodutivos em relação aos adultos, sendo considerados então como bons modelos na investigação dos processos ecológicos, bem como nas relações entre mudanças globais e seus impactos para a biodiversidade (Eterovick & Barata, 2006; Andrade et al. 2007; Becker et al., 2017).

Uma ferramenta usualmente utilizada para o monitoramento das alterações ambientais é a assimetria flutuante (AF), que se fundamenta nos desvios no desenvolvimento ontogenético de caracteres bilaterais (Palmer & Strobeck 1986; Sanseverino & Nessimian, 2008). Essa ferramenta baseia-se na medição de uma série de características discretas e/ou contínuas, em ambos os lados dos indivíduos de uma mesma espécie, com intuito de observar se um determinado fator externo estressante influencia o desenvolvimento ontogenético dos mesmos (Hogg et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado uma relação positiva entre os índices de assimetria flutuante e os níveis de perturbação antrópica em diversos grupos (Palmer, 1994; Wright & Zamudio 2002; Delgado-Acevedo & Restrepo, 2008; Costa & Nomura, 2016; Costa et al., 2017) e sugerem que o aumento nas frequências de assimetria flutuante ao longo do tempo pode gerar impactos negativos na homeostase das populações, como declínios populacionais e aumento nas taxas de extinções locais (Markow, 1995). Estudos com a utilização dessa ferramenta (AF) podem demonstrar se existe uma resposta dos organismos em relação aos fatores estressantes (e.g. aumento da temperatura da água, estresse hídrico), possibilitando inferências e previsões destes efeitos em cenários futuros. Alterações nesse âmbito podem ter influências na dinâmica das populações/comunidades e conseqüentemente alterações nas teias tróficas, tendo conseqüências diretas e indiretas para o funcionamento dos ecossistemas e dos serviços ambientais prestados. As lacunas de conhecimento sobre as características das espécies e de como elas são influenciadas pelas alterações do ambiente, principalmente as oriundas de ação antrópica são um dos desafios para o entendimento sobre quais as reais ameaças a biodiversidade e de como podemos minimizar tais efeitos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a mortalidade, o crescimento (tamanho do corpo), o estágio de desenvolvimento e os índices de assimetria flutuante em girinos de uma espécie de anuro em relação as mudanças na temperatura e no volume de água. Espera-se que a temperatura aumente a velocidade de metamorfose, em detrimento do tamanho dos indivíduos, assim como o estresse hídrico, e que estes fatores aumentem os índices de assimetria flutuante nos girinos de *D. minutus*, pois são fatores de alta pressão de seleção.

Material e Métodos

Coleta de dados

Foram coletados 10 casais em amplexo da espécie *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) em um corpo d'água de hidroperíodo lântico, localizado na região Sul da Bahia, município de Maraú, Brasil. A poça estava inserida em um ambiente de área aberta e arenosa, com vegetação herbácea-arbustiva, caracterizada como brejo de restinga (Widmer, 2009). Cada casal foi acondicionado em sacos plástico com água para postura dos ovos. Após a desova, os casais foram soltos em seus respectivos habitats de coleta. Em laboratório, armazenamos as desovas em aquários de vidro (100cm X 80cm X 60cm) com água descloretada para posterior eclosão e aleatorização dos girinos, reduzindo um potencial efeito parental no experimento. Os girinos foram mantidos nos aquários de armazenamento a uma temperatura ambiente de 25° C e alimentados com ração de peixe (AlconBasic MEP 200) até atingirem o estágio de desenvolvimento 25 (*sensu* Gosner, 1960).

Sistema de estudo

Como unidades experimentais (U.E.) utilizamos mesocosmos criados em caixas d'água de polietileno (100L). Em cada mesocosmo foi adicionado 90L d'água (descloretada), 2kg de areia (substrato), 0.25m² de *Salvinia auriculata* (samambaia aquática), além de 200ml d'água coletados dos corpos d'água em que foram retirados. A água coletada nos corpos d'água serviu como fonte de alimento para os girinos com a proliferação de zoo e fito plâncton. As U.E. foram cobertas com telas plásticas para evitar a entrada de outros organismos e posicionados sob uma mesma condição de sombreamento. Após a montagem, os mesocosmos foram monitorados por trinta dias para estabilização da biota. O pH e temperatura foram monitorados a cada dois dias e após a estabilização dos mesocosmos (i.e., similaridade de condições abióticas entre eles) foi realizado o experimento.

A priori, adicionamos 25 girinos em cada U.E., coletados aleatoriamente no aquário de armazenamento. Os girinos foram aclimatados nos mesocosmos por 48 horas antes do início da experimentação. Para executar o experimento aplicamos os seguintes tratamentos em relação ao aumento na temperatura e à redução do volume d'água: C = temperatura ambiente + 90L d'água (controle); T1 = temperatura alta + 90L d'água (aquecimento da água); T2 = temperatura ambiente + 20L d'água (estresse hídrico); T3 = Temp. Alta + 20L d'água (estresse hídrico e aquecimento da água). Nos tratamentos associados ao aumento da temperatura (i.e. Temp. Alta), utilizamos um cenário mais

pessimista apresentado pelo relatório de IPCC (2014), onde teremos um aumento da temperatura média de 4,8°C ainda para este século. Sendo assim, os tratamentos com as temperaturas altas variaram entre 29 - 30°C, e os tratamentos com a temperatura ambiente (controle) variaram de 24 - 25°C. Embora essas previsões correspondam às medidas do ar, estudos demonstram que as temperaturas do ar se correlacionam bem com a temperatura da água em córregos e lagos (Livingstone & Lotter, 1998; Webb et al., 2003) Utilizamos controladores de temperatura AquaTerm AT-1 para manter a temperatura da água dos mesocosmos, além de aquecedores LifeTech, os quais foram utilizados nos tratamentos com temperatura alta. Nos tratamentos de redução do volume d'água, utilizamos mangueiras de sucção, reduzindo o volume d'água continuamente uma única vez, até o volume limite (20L), equivalente a sete centímetros de altura da lâmina d'água, como simulação de estresse hídrico. A cada três dias os volumes de água foram revisados para que mantivessem o volume d'água desejado (20 ou 90 litros) para reduzir o viés da evaporação e manter os tratamentos dentro da categorização.

A ordem de aplicação dos tratamentos e a posição das U.E. na área de experimentação foram aleatorizadas através de sorteio. A duração total do experimento foi de 25 dias (600 horas). Replicamos 7 vezes cada tipo de tratamento, totalizando 28 unidades experimentais (figura 1 e 2). Após este período os indivíduos foram eutanasiados em solução aquosa de benzocaína e fixados em solução de formalina a 10%, para aferimento das medidas a serem coletadas (mortalidade, tamanho corporal e assimetria flutuante) e posteriormente depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Estadual de Santa Cruz (MZUESC).

Para a análise da mortalidade utilizamos os valores brutos do número de mortes por unidade experimental (mesocosmo). O tamanho do corpo foi obtido através de imagem fotográfica na lupa Alltion em vista dorsal com câmera BestScope (BHC21080P) e mensurados através do software ImageJ 1.46r. Utilizamos o sensu Gosner 1960 para classificação dos estágios larvais. Para a análise de assimetria flutuante utilizamos cinco estruturas morfológicas para cada indivíduo conforme figura 3 (Tabela 1) (Costa & Nomura, 2016). Foram medidos 35 indivíduos no controle, 34 no tratamento T1, 35 no tratamento T2 e 35 no tratamento T3, totalizando 139 indivíduos medidos.

Utilizamos o teste de ANOVA one-way para verificar, independentemente, se existe diferença nas taxas mortalidade, e se os estágios de desenvolvimento das larvas foram diferentes entre os tratamentos. O mesmo teste foi utilizado para analisar se o tamanho do corpo dos indivíduos difere entre os tratamentos testados. A posteriori, o teste de Tukey HSD foi utilizado, para cada variável resposta, na comparação das médias entre os tratamentos.

Avaliamos a existência de assimetria flutuante (AF) utilizando o protocolo sugerido por Palmer & Strobeck (1986). A assimetria flutuante de cada indivíduo foi calculada pelo índice $AF = D - E$, para cada estrutura, onde D representa o lado direito e E o lado esquerdo do plano de simetria em organismos bilaterais. Utilizamos teste de Grubbs para identificação e retirada dos outliers das análises de AF. Outliers podem introduzir efeitos indesejáveis nestas análises, pois a diferença entre os lados (D - E) é bem pequena e medições anômalas podem produzir valores de AF anômalos, obtendo respostas confusas e de difícil interpretação (Palmer & Strobeck, 2001).

As medidas de cada estrutura foram realizadas duas vezes em tempos diferentes (uma a cada semana) para análise de possíveis erros de medição significativos. Usando o lado como fator fixo e os indivíduos como fator aleatório, realizamos uma ANOVA modelo misto, onde o quadrado médio do erro não pode ser maior que o quadrado médio da interação entre o lado e o indivíduo. Se isso ocorrer, a confiabilidade de suas medidas é questionável, tendo que excluir a estrutura ou medi-la novamente (Palmer & Strobeck, 2001). Para a análise dos pressupostos, com os índices obtidos realizamos um teste t (single sample) para avaliar se as médias obtidas são significativamente diferentes de zero e inferir ou não a existência de AF. Em seguida, realizamos um teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) para avaliar se os índices de AF apresentam distribuição normal e também uma correlação de Spearman para verificar se os índices de AF são independentes do tamanho do corpo dos indivíduos e do tamanho médio de cada estrutura. Após definir a existência e qual o tipo de assimetria encontrada, extraímos os índices absolutos de AF pelo índice $AF = |D - E|$.

Utilizamos uma ANOVA one-way para avaliar se os níveis de assimetria flutuante em cada estrutura dos girinos de *D. minutus* são influenciados pelo aumento da temperatura e pela redução do volume d'água nos mesocosmos.

Resultados

Efeito sobre a mortalidade, estágio larval e o tamanho corporal

A análise de variância (ANOVA one-way) mostrou que existe um aumento na taxa de mortalidade em girinos de *D. minutus* nos diferentes tratamentos ($F(3) = 5,859$, $p = 0,003$). O teste de Tukey mostrou que os valores de mortalidade tiveram significância em comparação com o controle apenas para os tratamentos com aquecimento de água T1 ($p = 0,01$) e T3 ($p = 0,02$) (figura 4). O tratamento com estresse hídrico não apresentou níveis de mortalidade diferentes do tratamento controle ($p = 0,90$).

O tamanho corporal dos girinos de *D. minutus* também foi influenciado, apresentando valores significativos em relação aos tratamentos ($F(3) = 5,219$, $p = 0,001$), mas o teste de Tukey nos mostrou que, apenas o tratamento T1 ($p = 0,01$) se diferenciou estatisticamente do tratamento controle. O tratamento T3, apesar de não ser significativo ($p = 0,05$), apresentou tamanhos corporais médios menores que os girinos do controle (figura 5), podendo ser um indício de uma tendência a essa resposta. O tratamento com estresse hídrico (T2) não se diferenciou do controle nesta abordagem ($p = 0,99$). Isso demonstra que o aquecimento da água, é um dos fatores de maior relevância tanto na sobrevivência dos girinos de *D. minutus* quanto no crescimento corporal dos mesmos. Não houve diferença significativa nos estágios de desenvolvimento larvais entre os tratamentos utilizados ($F = 0,3$, $p = 0,82$).

Assimetria Flutuante

O teste de Grubbs apresentou dois outliers para as estruturas CO, LN e DNF e um outlier para as estruturas LO e DOF, dos quais todos foram retirados, conforme sugerido pelo protocolo (Palmer & Strobeck, 2001). A ANOVA modelo misto mostrou que para todas as estruturas, as medidas são confiáveis, pois o erro de medição é muito pequeno e menor que a AF (tabela 2). Com essa análise é possível avaliar também a inexistência de assimetria direcional (quando o lado é significativo) e de antissimetria (AF dependente do indivíduo), ou seja, existe uma variação entre os lados, mas o lado não importa, nem os indivíduos, pois os desvios são aleatórios (tabela 3). Todas as estruturas apresentaram AF exceto a estrutura DOF, que apresentou assimetria direcional ($p = 0,042$) (ver também tabela 2). A assimetria direcional é, segundo Palmer & Strobeck (2001), um complexo de efeitos genéticos e ambientais direcionais, possivelmente,

efeitos da taxa de crescimento alométrica. Estes efeitos podem inflar os valores de AF devido a sua natureza direcional e por isso devem ser retirados das análises (Palmer & Strobeck, 1992; Palmer, 1994).

Outra forma de avaliar o tipo de assimetria foi com o teste-t (one sample). Os valores de AF (D – E) não podem ser significativamente diferentes de zero, pois estes desvios são muito pequenos e truncados a zero. Caso esses valores sejam significativamente diferentes de zero, o tipo de assimetria é direcional. Conforme previsto pela ANOVA de modelo misto, e agora afirmado pelo teste one sample, apenas a estrutura DOF apresentou valores significativos diferentes de zero (ver tabela 3), as demais estruturas apresentaram valores não significantes. Como sugerido, a medida foi excluída das demais análises. O teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) mostrou que os índices de AF apresentaram distribuição normal para todas as estruturas analisadas: CO, LO, LN e DNF (tabela 3), a estrutura DOF não foi mais incluída na análise. Não houve correlação entre os índices de AF e o tamanho do corpo dos girinos, assim como, dos índices de AF e do tamanho médio da estrutura (tabela 4). Após testados todos pressupostos, as análises foram seguidas.

O teste de ANOVA mostrou que, os índices de assimetria flutuante não foram significativos. Nenhuma das quatro estruturas mensuradas apresentaram diferenças quando os índices de AF foram comparados entre os tratamentos experimentais: CO (F(3)= 0,691; p= 0,558), LO (F(3)=2,012; p= 0,115), DN (F(3)= 1,967; p= 0,121) e DNF (F(3)= 0,930; p= 0,428). A estrutura DOF não foi analisada por não se adequar aos pressupostos da análise de assimetria flutuante.

Discussão

O grupo dos anfíbios é um dos grupos mais susceptíveis as mudanças ambientais devido a características fisiológicas, ecológicas e de história de vida bastante sensíveis a fatores como temperatura e umidade (Katzenberger et al., 2012). Pouco se sabe sobre as reais respostas dos organismos as alterações ambientais climáticas, podendo algumas espécies responderem de forma positiva e outras de forma negativa (Haddad et al., 2008). Encontramos taxas de mortalidade maiores para os girinos de *D.minutus* nos tratamentos com aquecimento da água (T1 e T3) do que no tratamento com estresse hídrico (T2) e tratamento controle (C). Isso demonstra o quanto essa variável é de total relevância na sobrevivência das larvas de anuros, pois elas, apesar de apresentarem uma alta

plasticidade fenotípica (fator este que permite rápidas adaptações dos girinos as mudanças do ambiente), muitos destes organismos não são capazes de se adaptar rápido o suficiente para persistir nestes ambientes ao longo do tempo, devido ao fato que as mudanças neste âmbito são muito rápidas e severas (Lavergne et al., 2010; Salamin et al., 2010; Bellard et al., 2012), principalmente para este grupo de natureza ectotérmica (Duellman & Trueb, 1986; Ultsch et al., 1999 ; Maciel & Jucá, 2009). Além disso, diversos autores apontam os efeitos indiretos do aquecimento, como a limitação do oxigênio disponível e redução na quantidade de alimento como fatores de influência na mortalidade e nos declínios populacionais destes organismos (Carey & Alexander, 2003; Pörtner & Knust, 2007; Blaustein et al., 2010). O tratamento com estresse hídrico não mostrou níveis diferentes de mortalidade em relação ao controle, pois, talvez, o que consideramos como sendo um baixo volume de água (20L) para o estresse hídrico, pode não ter sido para as larvas de *D. minutus*, o que deixou de gerar alguns estímulos de reconhecimento deste efeito para estes organismos, como por exemplo, a redução considerável no espaço de locomoção e a proximidade com a superfície (Denver et al., 1998; Maciel & Jucá, 2009). Novos experimentos para testar os diferentes volumes de água sobre girinos de *D. minutus* fazem-se necessários para o real entendimento dos efeitos causados por este impacto.

Bellard et al. (2012) sugerem três direções das respostas as mudanças climáticas através da plasticidade fenotípica ou resposta evolutiva: espaço (range), tempo (fenologia) e “self” (fisiologia). A primeira refere-se a resposta espacial, onde as espécies podem seguir as condições do espaço, selecionando ambientes com as condições necessárias para a sua sobrevivência. Perry et al. (2005), encontrou um deslocamento de diversas espécies de peixes para áreas térmicas mais favoráveis, suportando a hipótese de que as espécies se deslocam no espaço para assegurar condições climáticas suportáveis. Estas mudanças espaciais podem atuar de forma local (microambientes) ou regional, geralmente associadas a capacidade de dispersão de cada organismo (Parmesan 2006), que buscam as condições climáticas ambientais nas quais são adaptados. Visser (2008) no entanto, afirma que, esse deslocamento espacial para seleção destes ambientes climáticos favoráveis, podem fazer com que os organismos deixem de encontrar outras condições abióticas (e.g. fotoperíodo e pluviosidade) ou mesmo bióticas (e.g. predação e competição) as quais são adaptados, afetando possivelmente a persistência neste novo ambiente. Apesar de não ter sido avaliada uma resposta espacial em nosso experimento, pôde-se notar que os girinos de *D. minutus* preferiram locais próximos a vegetação de

Salvinia auriculata (samambaia aquática) e mais distantes da fonte de calor (aquecedor), talvez por estes locais serem mais amenos termicamente. Esse resultado foi encontrado em outros estudos que avaliaram a exposição de larvas de algumas espécies a temperatura e a radiação UVB, e observaram respostas dependentes da espécie, ou seja, algumas preferiram se esconder outras não (Bancroft et al. 2008; Yu et al. 2014). Em nosso trabalho essa resposta é apenas especulativa e não pode ser corroborada com nossos resultados. O tempo é uma outra resposta possível às mudanças climáticas, onde as espécies alteram seus traços de história de vida na tentativa de combinar seu ciclo biológico as novas condições do meio. Uma das respostas mais presentes as mudanças climáticas no século XX são as alterações fenológicas, e já foram documentadas para muitas espécies nas mais diversas formas, como em migrações sazonais, alterações nos ciclos reprodutivos, floração e frutificação (e.g. Root et al., 2003; Parmesan, 2006; Charmantier et al., 2008; Todd et al., 2010). Essas mudanças podem auxiliar as espécies a manter o sincronismo com fatores abióticos cíclicos, mas também podem funcionar como fatores perturbadores uma vez que, assim como a resposta espacial, elas podem deixar de encontrar outras condições necessária à sua vida (Parmesan, 2006; Bellard et al., 2012). Nenhuma resposta temporal foi avaliada no presente estudo e portanto, não podemos inferir nenhuma mudança em relação ao fator tempo. Por último, os organismos podem ter uma resposta fisiológica, denominada por Bellard et al. (2012), como sendo a resposta “self”, ou “auto resposta”, podendo alterar características mecânicas, físicas e bioquímicas nos seres vivos. Diversos trabalhos reportam a essas mudanças em várias características para os organismos em função da alteração climática (Merila et al., 2000; Browne & Edwards, 2003; Maciel & Jucá, 2009; Johansen & Jones 2011; Becker et al., 2017), principalmente para os ectotérmicos, pois, algumas de suas características são mais sensíveis a temperatura como o crescimento, a locomoção a reprodução e a determinação do sexo (Tewksbury et al., 2008). A mudança nestas características é mediada pela fisiologia dos organismos, o que limita a plasticidade da alteração destes traços, como no caso das taxas metabólicas e tamanho corporal por exemplo, que não podem aumentar ou diminuir indefinidamente em resposta a efeitos climáticos (Chevin et al., 2010).

Em nossos resultados, além do efeito agudo (morte), também obtivemos uma resposta fisiológica, ou resposta “self”, em relação ao incremento da temperatura. Os girinos da espécie *D. minutus* submetidos a altas temperaturas (T1 e T3) tiveram uma redução no tamanho corporal quando comparados aos girinos dos tratamentos com

temperatura ambiente (C e T2). Estudos sugerem que temperaturas quentes aceleram a velocidade do desenvolvimento larval em detrimento do tamanho corporal dos metamorfos (Collins, 1979; Van der Have & Jong, 1996; Blouin & Brown, 2000; Maciel & Jucá, 2009), podendo afetar a performance (e.g. escape de predadores, resistência a fome e a dessecação, vantagem competitiva) e a sobrevivência destes organismos em sua nova fase de vida (Smith, 1987; Tracy et al., 1993; Watkins, 2001). Não observamos diferenças nos estágios de desenvolvimento entre nossos tratamentos, mas nossos resultados sobre a influência da temperatura sobre o tamanho corporal inferem que, mesmo sem uma diferença nos estágios larvais, a temperatura influenciou negativamente no crescimento dos girinos de *D. minutus*. Essa plasticidade térmica apresentada pelo tamanho corporal é chamada de “the temperature-size rule” (Angilletta et al., 2004) e tem a capacidade de modificar a duração, o processo de metamorfose, o desenvolvimento, a fisiologia e a morfologia de estágios mais avançados (Downie et al., 2004; Niecieza et al., 2006; Walsh et al., 2008a,b). Efeitos da temperatura sobre o tamanho corporal de girinos tem sido relatado para correlações positivas (Browne & Edwards, 2003; Maciel & Jucá, 2009) e negativas (Maciel & Jucá, 2009). Uma possível inferência sobre essas duas respostas são a de que os organismos, especialmente os ectotérmicos, possuem uma temperatura ambiental ótima para seu desenvolvimento e crescimento (Browne & Edwards, 2003; Deutsch et al., 2008), podendo responder de ambas as formas, dependendo do quão próximo a temperatura do ambiente estará intervalo ótimo da eficácia biológica. Outra possível resposta é a influência da alta temperatura no incremento das taxas metabólicas dos organismos ectotérmicos (Tewksbury et al., 2008), no aumento do gasto energético (Pandian & Marian, 1985a) e/ou na diminuição na assimilação de nutrientes (Browne & Edwards, 2003; Liess et al., 2013), fatores que poderiam gerar uma redução no incremento corporal. Em temperaturas mais frias as taxas metabólicas reduzidas permitem um maior armazenamento de lipídeos e reduzem conversão de nutrientes para outros tecidos (Pasanen & Koskela, 1974; Browne & Edwards, 2003), o que corrobora, respectivamente, a influência do tamanho e não do estágio de desenvolvimento em girinos de *D. minutus*, mas essa resposta não pode ser afirmada pelo presente estudo.

Não houve diferenças significativas entre os índices de AF e os diferentes tratamentos ambientais. Possivelmente, as espécies deste grupo, incluindo *D. minutus*, já tenham experimentado em seu histórico de vida evolutivo, variações de temperaturas

similares as testadas em nosso estudo. Altas temperaturas podem ser uma fonte considerável de estresse fisiológico sobre girinos, constituindo possivelmente uma importante pressão de seleção, que tem favorecido a evolução adaptativa em suas tolerâncias térmicas máximas (Tejedo et al., 2012). Dados não publicados demonstram que a temperatura crítica máxima (CT_{max}), que é definida como "a temperatura que o indivíduo apresenta desorganização de sua atividade locomotora perdendo a habilidade necessária para designar funções essenciais a vida" (Cowles & Bogert, 1944), para algumas espécies do mesmo grupo que *D. minutus*, são muito acima que as temperaturas testadas neste experimento (11°C em média). Tejedo et al. (2012), cita em seu trabalho que, os ambientes pouco profundos e temporários localizados em áreas abertas e ensolaradas, principalmente nas regiões tropicais ou subtropicais, como é o caso dos sítios reprodutivos de *D. minutus*, podem alcançar temperaturas muito altas, oscilando entre 35°C – 43°C , logo, as temperaturas previstas pelo IPCC (incremento de 4,8°C) podem de certa forma, aumentar ainda mais as temperaturas experimentadas por esses locais, podendo se tornar um fator de grande pressão nas larvas desta espécie, uma vez que essas temperaturas poderiam atingir valores muito mais elevados e próximos a temperaturas críticas destes organismos . A forma em que o organismo responderá com maior sensibilidade a um agente estressor vai depender da natureza e da concentração deste mesmo agente no meio ambiente (Sanseverino & Nessimian, 2008). A relação entre a mortalidade, o tamanho e a temperatura, então pode ser associada a efeitos indiretos do aquecimento das águas, uma vez que, a temperatura pode não estar atuando como um fator estressante direto no declínio dos anfíbios (Collins & Crump, 2009), ou mas provavelmente estarem atuando de forma sinérgica ambos os efeitos.

Os índices de AF não significativos nos fazem assumir que os efeitos indiretos do aquecimento podem ser, para os sobreviventes, mais danosos que o efeito do aumento da temperatura em si. A qualidade e quantidade de alimento, por exemplo podem ter influência direta no crescimento dos girinos (Álvarez & Nicieza, 2002a), produzindo indivíduos menores e mais susceptíveis a predação, à fome e a dessecação (Smith, 1987; Tracy et al., 1993; Watkins, 2001), podendo indiretamente afetar as taxas de sobrevivência tanto de larvas, como em metamorfos e adultos (Blouin & Brown, 2000; Altwegg & Reyer, 2003). Efeitos indiretos associados ao aquecimento global, como a redução na umidade em ambientes terrestres e aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas emergentes, já haviam sido reportados como causas do declínio de populações

de anfíbios (Pounds et al., 2006). As interações interespecíficas nas comunidades também podem sofrer influência das mudanças climáticas (Tejedo et al., 2012), podendo induzir alterações fenológicas no ciclo de vida, promovendo desajuste temporais entre disponibilidade de alimento e consumidores, assim como, influenciar as relações com predadores e competidores (Sanz et al., 2003; Durant et al., 2007; Tejedo et al., 2012), nas quais são totalmente decisivas para a manutenção das comunidades, principalmente diante um cenário de alteração climática (Pincebourde et al., 2008; Peck et al., 2009; Tejedo et al., 2012).

Como efeito destas respostas, espera-se uma nova estruturação nas comunidades de anfíbios anuros, fruto de uma alta abundância relativa das espécies favorecidas pelas mudanças climáticas e pela redução na riqueza específica causada pelo possível declínio ou extinção das espécies prejudicadas (Thomas et al., 2004; Araújo & Rabek, 2006; Haddad et al., 2008). Os efeitos sinérgicos diretos e/ou indiretos na sobrevivência das populações de anfíbios causados pelas mudanças climáticas ainda são pouco conhecidos, no entanto, alguns autores sugerem que o declínio global de anfíbios seja resultado da combinação de múltiplos fatores subletais (Sih et al., 2004; Pounds et al., 2006), através de mecanismos biocomplexos que só poderão ser explicados no futuro (Haddad et al., 2008). O incremento da temperatura juntamente com outros fatores indiretos resultantes das alterações climáticas poderão ser agentes limitantes para que algumas espécies consigam evoluir e adaptar-se, logo, se estas espécies forem incapazes de amortecer os impactos advindos destas alterações ambientais, sofrerão com altas taxas de declínio populacional e poderão enfrentar a extinção no futuro (Haddad et al., 2008; Lavergne et al., 2010; Salamin et al., 2010; Bellard et al., 2012).

A estrutura do ambiente, juntamente com a heterogeneidade e a variação térmica dos micro-habitats, possibilitam as espécies experimentarem menores variações ambientais advindas das mudanças climáticas globais, o que tem efeitos diretos sobre a vulnerabilidade das espécies (Tejedo et al., 2012), mostrando a importância da preservação de ambientes naturais distintos. Assim, a priorização de locais protegidos deve estar ligada a lugares que possibilitem a minimização dos efeitos das mudanças climáticas globais (Carnaval et al., 2009; Bellard et al., 2012; Tejedo et al., 2012), assegurando assim a persistência das condições necessárias para o funcionamento e manutenção dos ecossistemas naturais. A busca pela compreensão dos reais impactos, diretos ou indiretos, negativos ou positivos, das mudanças climáticas ainda é um desafio

para a sociedade acadêmica pois, estes fatores agem concomitantemente a inúmeros outros fatores de impacto. Estudos com mesocosmos, são capazes de auxiliar no entendimento de como, em uma escala menor, os organismos podem responder frente as alterações ambientais, buscando inferências para uma escala mais ampla e realista, contribuindo na tomada de decisões frente a crises na biodiversidade.

Referências Bibliográficas

Altig, R., & McDiarmid, R. W. 1999a. Diversity: Familial and Generic Characterizations. *In: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (Eds.) Tadpoles. The Biology of Anuran Larvae.* University of Chicago Press, Chicago and London, p. 295–337.

Altig, R., & McDiarmid, R. W. 1999b. Body Plan: Development and Morphology. *In: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (Eds.) Tadpoles. The biology of anuran larvae.* University of Chicago Press, Chicago and London, p. 24–51.

Altwegg, R. & Reyer, H. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 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.

Andrade, G. V., Eterovick, P. C., Rossa-Feres, D. C. & Schiesari, L. 2007. Estudos sobre girinos no Brasil: histórico, conhecimento atual e perspectivas. In Nascimento, L.B. & Oliveira, E. (Org.). *Herpetologia no Brasil II.* Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. vol. 1, p. 127-146.

Angilletta, M., Steury, T., Sears, M. 2004. Temperature, growth rate and body size in ectotherms: fitting pieces of a life history puzzle. *Integrative and Comparative Biology* 44, 498–509.

Araújo, M. B. & Rahbek, C. 2006. How Does Climate Change Affect Biodiversity? *Science* 313, 1396 – 1397.

- Bancroft, B. A., Baker, N. J., Searle, C. L., Garcia, T. S., & Blaustein, A. R. 2008. Larval amphibians seek warm temperatures and do not avoid harmful UVB radiation. *Behavioral Ecology*, 19(4), 879-886.
- Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G. O., Swatz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B. & Ferrer, E. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471, 51-57.
- Becker, F. S., Tolley, K. A., Measey G. J & Altwegg, R. 2017. Extreme climate-Induced Life-History Plasticity in Amphibian. *The American Naturalist* 191(2), 1 – 9.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W. & Courchamp, F. 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters* 15, 365–377.
- Blaustein, A. R.; Walls, S. C.; Bancroft, B. A., Lawler, J.J., Searle, C.L. & Gervasi, S.S. 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity* 2(2), 281–313.
- 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.
- Browne, R. & Edwards, D. 2003. The effect of temperature on the growth and development of the endangered green and golden bell frog (*Litoria aurea*). *Journal of Thermal Biology* 28(4): 295-299.
- Carey, C. & Alexander, M. A. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions* 9(2), 111–121.
- Chevin, L. -M., Lande, R. & Mace, G. M. 2010. Adaptation, plasticity and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biology* 8(4), e1000357.
- Collins, J. 1979. Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ecology* 60, 738-749.
- Collins, J. P. & Crump, M. L. 2009. Extinction in our Times. Global Amphibian Decline. *Oxford University Press. Oxford.*
- Collins, J. P. & Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9, 89-98.

- Conte, C. E. & Rossa-Feres, D. C. 2007. Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros em um remanescente de Floresta com Araucária no sudeste do Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* 24(4), 1025-1037.
- Costa R. N., Solé M. & Nomura. F. 2017. Agropastoral activities increase fluctuating asymmetry in tadpoles of two neotropical anuran species. *Austral Ecology* 42: 801-809.
- Costa R. N. & Nomura F. 2016. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia* 765: 85 – 96.
- Cowles, R. B., Bogert, C. M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 83, 263-296.
- Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* 128(2), 231-240.
- Dawson, T. P., Jackson, S.T., House, J. I., Prentice, I. C. & Mace, G. M. 2011. Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. *Science* 332, 53-8.
- Delgado-Acevedo, J., and C. Restrepo. 2008. The Contribution of Habitat Loss to Changes in Body Size, Allometry, and Bilateral Asymmetry in Two *Eleutherodactylus* Frogs from Puerto Rico. *Conservation Biology* 22(3), 773–782.
- Denver, R., Mirhadi, N. & Phillips, M. 1998. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat dessication. *Ecology* 79 (6): 1859-1873.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C. & Martin, P. R. 2008. Impact of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6668–6672.
- Duarte, H., Tejedo, M. & Katzenberger, M. 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology*, 18, 412–421.

Duellman, W. E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibian*. New York, McGraw-Hill, Book Company, 670p.

Durant, J. M., Hjermand, D. Ø., Geir Ottersen, G. & Stenseth, N. C. 2007. Climate and the match or mismatch between predator requirements and resource availability. *Climate Research*, 33: 271-283.

Eterovick, P. C. & Barata, I. M. 2006. Distribution of tadpoles within and among Brazilian streams: the influence of predators, habitat size and heterogeneity. *Herpetologica* 62(4), 365 – 377.

Fonseca, C. R., Becker, C. G., Haddad, C. F. B. & Prado, P. I. 2008. Metamorfose: o declínio mundial dos anfíbios é agravado pela desconexão entre o hábitat aquático dos girinos e o hábitat terrestre dos adultos, induzida pelas atividades humanas. *Scientific American* 72, 88-93.

Gilman, S. E., Urban, M. C., Tewksbury, J., Gilchrist, G. W. & Holt, R. D. 2010. A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 325–331.

Goldstein, J. A., von Seckendorff, K. & Hillyard, S. D. 2017. The effect of temperature on development and behavior of relict leopard frog tadpoles. *Conservation Physiology* 5, 1-8.

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

Gutiérrez-Pesquera, L. M., Tejedo, M., Ollala-Tárraga, M. A., Duarte, H., Nicieza, A., & Solé, M. 2016. Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. *Journal of Biogeography*. 43, 1-23.

Haddad, C. F. B., Giovanelli, J. G. R. & Alexandrino, J. 2008. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. *Biologia & Mudanças Climáticas no Brasil. Dimensão Zoológica* 5-16.

Hoffman, A. A. & Sgro, C. M. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470, 479–485.

- Hogg, I. D., Eadie, J. M., Williams, D. D. & Turner, D. 2001. Evaluating Fluctuating Asymmetry in a Stream-Dwelling Insect as an Indicator of Low-Level Thermal Stress: A Large-Scale Field Experiment. *Journal of Applied Ecology* 38:1326-1339.
- Huey, R. B. & Stevenson, R. D. 1979. Integrating physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *American Zoologist* 19, 357-366.
- Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A. M., Jess, M. & Williams, S. E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 1665–1679.
- IPCC (2014) Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. 1–76.
- Johansen, J. L. & Jones, G. P. 2011. Increasing ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes. *Global Change Biology* 17, 2971–2979.
- Katzenberger, M., Tejedó, M., Duarte, H., Marangoni, F. & Beltrán, J.F. 2012. Tolerância e sensibilidade térmica em anfíbios. *Revista da Biologia* 8, 25-32.
- Lafferty, K. D. 2009. The ecology of climate change and infectious diseases. *Ecology*, 90, 888–900.
- Lavergne, S., Mouquet, N., Thuiller, W. & Ronce, O. 2010. Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematization* 41, 321-350.
- Lemoine, N., Bauer, H.G., Peintinger, M. & Bohning-Gaese, K. 2007. Effects of climate and land-use change on species abundance in a central European bird community. *Conservation Biology*, 21, 495–503.
- 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. *Journal Animal Ecology* 1111, 1365-2656.
- Livingstone, D. M. & Lotter, A. F. 1998. The relationship between air and water temperatures in lakes of the Swiss Plateau: a case study with paleolimnological implications. *Journal of Paleolimnology* 19, 181–198.

- Maciel, T. A. & Junca, F. A. 2009. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura). *Zoologia* 26 (3), 413–418.
- Mantyka-Pringle, C. S., MARTIN, T.G. & Rhodes, J.R. 2011. Interactions between climate and habitat loss effects on biodiversity: a systematic review and meta-analysis. Blackwell Publishing Ltd, *Global Change Biology*, 18, 1239–1252.
- Markow, T. A. 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology* 40, 105–120.
- Merila, J., Laurila, A., Pahkala, M., Rasanen, K. & Laugen, T. 2000. Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Écoscience* 7(1): 18-24.
- Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. G., Padilla, D. K. & Relyea R. A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 20(12), 685 – 692.
- Moore, F. R. & Gatten Jr, R. E. 1989. Locomotor performance of hydrated, dehydrated and osmotically stressed anuran amphibians. *Herpetologica* 45, 101-110.
- Orizaola, G. & Laurila, A. 2009b. Intraspecific variation of temperature-induced effects on metamorphosis in the pool frog (*Rana lessonae*). *Journal of Zoology* 87(7), 581–588.
- Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: A primer. p. 335-364. In: *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. (T. Markow, Ed.). Kluwer, Dordrecht.
- Palmer, A. R., & C. Strobeck. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* 191, 57-72.
- Palmer, A. R., & Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17, 391-421.

- Palmer, A. R., & Strobeck, C. 2001. Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. p. 279 – 319. In: *Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. (M. Polak, Ed.) Oxford University Press.
- Pandian, T. & Marian, M. 1985a. Predicting anuran metamorphosis and energetics. *Physiological Zoology* 58, 538-552.
- Pandian, T. & Marian, M. 1985b. Time and energy cost of metamorphosis in the Indian Bullfrog *Rana tigrina*. *Copeia* 3, 653-662.
- Parmesan, C. & Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37-42.
- Pasanen, S. & Koskela, P. 1974. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L. in northern Finland. *Comparative Biochemical Physiology* 47, 635–654.
- Peck, L. S., Clark, M. S., Morley, S. A., Massey, A. & Rossetti, H. 2009. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology* 23, 248–256.
- Pereira, H. M., Leadley, P. W. & Proença, V. 2010. Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science* 330, 1496-1501.
- Perry, A. L. 2005. Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science* 308(5730), 1912–1915.
- Pincebourde, S., Sandford, E. & Helmuth, B. 2008. Body temperature during low tide alters the feeding performance of a top intertidal predator. *Limnology and Oceanography* 53, 1562–1573.
- Pörtner, H. O. & Knust, R. 2007. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science* 315(5808), 95- 97.
- Pounds, L. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, P. N. F., Marca, E. L., Master, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S. R., Sanchez-Azofeifa, G. A., Still, C.J. & Young, B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161–167.

- Relyea, R. A. 2002. Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues and connections to predator-induced plasticity. *Ecological Monographs* 72(4), 523 – 540.
- Root, B. A., Price, J. T. & Hall, K. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 47– 60.
- Salamin, N., Wu Est, R. O., Lavergne, S., Thuiller, W. & Pearman, P. B. 2010. Assessing rapid evolution in a changing environment. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 692–698.
- Sanseverino, A. M. & Nessimian, J. L. 2008. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. *Oecologia Bras.* 12(3), 382-405.
- Sanz, J. J., Potti, J., Moreno, J., Merino, S. & Frias, O. 2003. Climate change and fitness components of a migratory bird breeding in the mediterranean region. *Global Change Biology* 9, 461-472.
- Secor, S. M. & Faulkner, A. C. 2002. Effects of meal size, meal type, body temperature, and body size on the specific dynamic action of the marine toad, *Bufo marinus*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 557 – 571.
- Sih, A., Bell, A. M. & Kerby, J. L. 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 274-276.
- Smith, D. 1987. Adult recruitment in chorus frogs. Effect of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68, 344-350.
- Smith, D. 1987. Adult recruitment in chorus frogs. Effect of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68, 344-350.
- Tejedo, M., Duarte, H., Gutiérrez-Pesquera, L. M., Beltrán, J. F., Katzenberger, M., Marangoni, F., Navas, C., Nicieza, A. G., Relyea, R., Rezende, E. L., Richter-Boix, A., Santos, M., Simon, M. & Solé, M. 2012. El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Boletín Asociación Herpetológica Española* 32, 2–27.

Tewksbury, J. J., Huey, R. B. & Deutsch, C. A. 2008. Ecology – Putting the heat on tropical animals. *Science* 320, 1296–1297.

Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., Siqueira, M. F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F. Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Peterson, A. T., Phillips, O. L. & Williams, S. E. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145- 148.

Todd, B. D., Scott, D. E., Pechmann, J. H. K. & Gibbons, J. W. 2010. Climate change correlates with rapid delays and advancements in reproductive timing in an amphibian community. *Proceedings Biological Sciences / The Royal Society* 278(1715), 2191–2197.

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.

Ultsch, G., Bradford, D. & Freda, J. 1999. Physiology: coping with the environment, p. 189-214. In: R. MCDIARMID & R. ALTIG (Eds). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. Chicago, University of Chicago Press, 444p.

Van der Have, T. & Jong, G. 1996. Adult size in ectotherms: Temperature effects on growth and differentiation. *Journal Theoretical Biology* 183, 329-340.

Van der Have, T. & Jong, G. 1996. Adult size in ectotherms: Temperature effects on growth and differentiation. *Journal of Theoretical Biology* 183, 329-340.

Visser, M. E. 2008. Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Philosophical Transactions of the Real Society B-Biological Sciences*, 275, 649–659.

Wake, D. B. & Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS* 105, 11466–11473.

Walther, G. R. 2010. Community and ecosystem responses to recent climate change. *Philosophical Transactions of the Real Society B-Biological Sciences* 365, 2019–2024.

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*. *Evolution* 55, 1668-1677

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*. *Evolution* 55, 1668-1677.

Webb, B. W., Clack, P. D. & Walling, D. E. 2003. Water–air temperature relationships in a Devon river system and the role of flow. *Hydrological Processes* 17, 3069–3084.

Widmer, W. M. 2009. “Restinga” Conceitos e empregos do termo no Brasil e implicações na legislação ambiental “por Souza *et al.*”. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 9(3), 95-96.

Wright, A. N., & K. R. Zamudio. 2002. Color pattern asymmetry as a correlate of habitat disturbance in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Journal of Herpetology* 36, 129–133.

Yang, L. H. & Rudolf, V. H. W. 2010. Phenology, ontogeny and the effects of climate change on the timing of species interactions. *Ecology Letters* 13, 1–10.

Yu, S., Weir, S. M., Cobb, G. P., & Maul, J. D. 2014. The effects of pesticide exposure on ultraviolet-B radiation avoidance behavior in tadpoles. *Science of the Total Environment* 481, 75- 80.

TABELAS E FIGURAS



Figura 1 – Esquema do sistema de estudo (mesocosmos) montados. A ordem de aplicação de cada tratamento foi aleatorizada.



Figura 2- Modelo do mesocosmos utilizado no experimento.

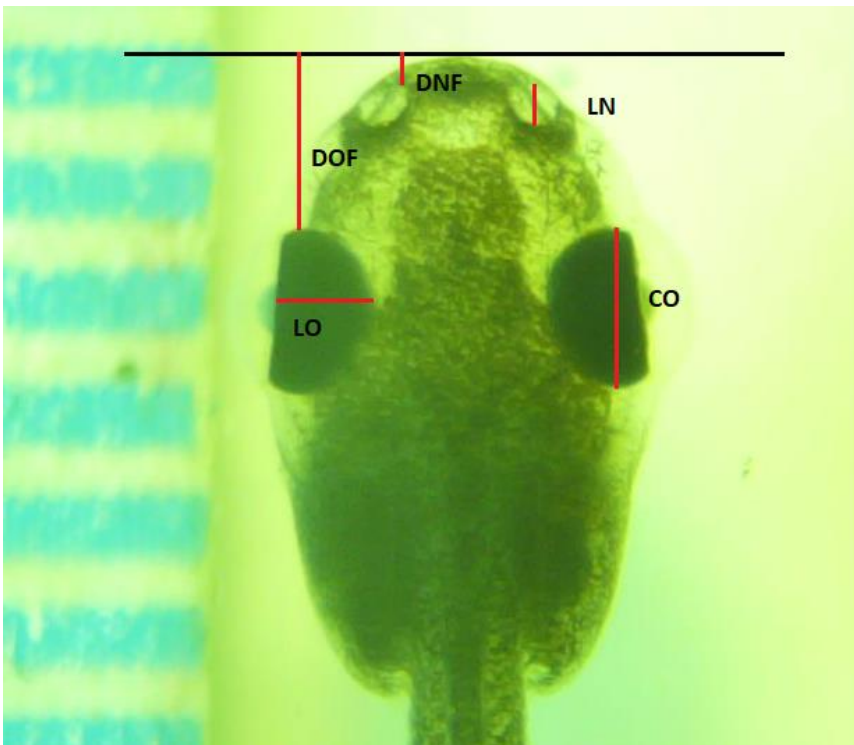


Figura 3 – Estruturas morfológicas mensuradas para cada lado do plano de simetria bilateral (D e E) em girinos de *D minutus*.

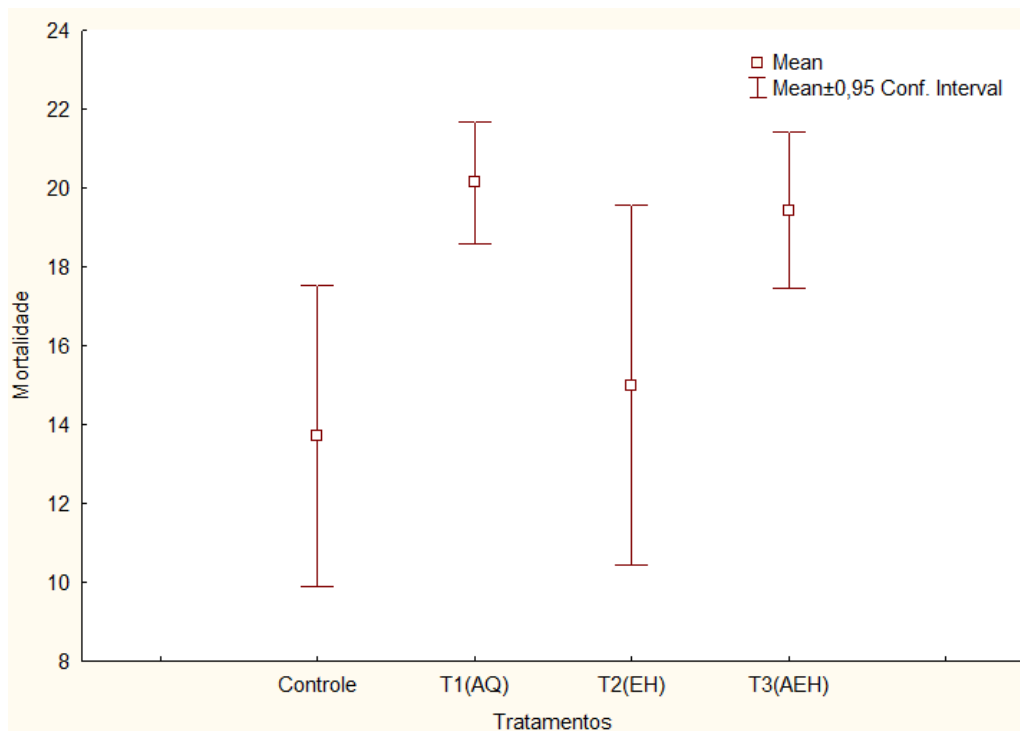


Figura 4 – Resultado da análise de ANOVA(one-way) para a mortalidade de girinos de *D. minutus*.

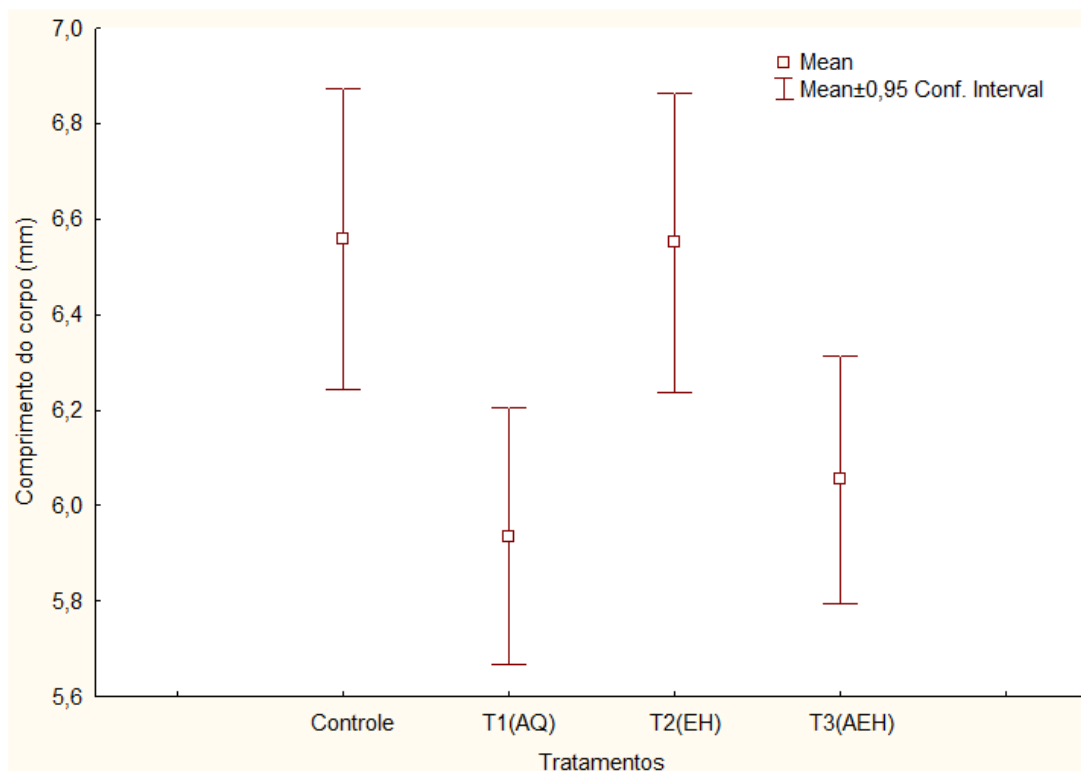


Figura 5 – Resultado da análise de ANOVA(one-way) para o comprimento corporal de girinos de *D. minutus*.

Tabela 1- Estruturas morfológicas bilaterais mensuradas para a obtenção dos valores de AF, e suas abreviações.

Estruturas mensuradas	Abreviação
1. Comprimento do olho	CO
2. Largura do olho	LO
3. Largura da narina	LN
4. Distância da narina ao focinho	DNF
5. Distância do olho ao focinho	DOF

Tabela 2- Resultados da ANOVA modelo misto para cada estrutura morfológica de *Dendropsophus minutus* mensurada. Note que o lado para a estrutura DOF foi estatisticamente significativo, apresentando assimetria direcional.

Estrutura morfológica	Quadrados médios (ANOVA)			
	Lado	Indivíduo	Lado x Indivíduo	Erro
CO	0.002	0.083**	0.001**	0.0001
LO	0.001	0.028**	0.003**	0.0003
LN	0.001	0.017**	0.001**	0.0003
DNF	0.005	0.018**	0.001**	0.0003
DOF	0.020*	0.230**	0.005**	0.0010

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Tabela 3- Resultado dos testes para validação de AF (test-t) e da normalidade de distribuição dos dados(Kolmogorov-Smirnov).

Estrutura Morfológica	N	test-t (<i>single sample</i>)	K - S
-----------------------	---	---------------------------------	-------

	t	g.l.	p	d	p
CO	-1.517	138	0.131	0.064	> 0.2
LO	0.842	138	0.401	0.051	> 0.2
LN	-1.214	138	0.226	0.074	> 0.2
DNF	-1.904	138	0.058	0.056	> 0.2
DOF	-2.287	138	0.023*	0.073	> 0.2

* $p < 0.05$

Tabela 4- Correlações entre os índices de AF com o comprimento do corpo (CC) e com o tamanho médio de cada estrutura medida (TM).

Estrutura morfológica	Spearman - CC		Spearman - TM		
	N	r	p	r	p
CO	139	-0.091	0.28	-0.036	0.67
LO	139	0.067	0.43	0.025	0.76
LN	139	0.031	0.71	0.017	0.84
DNF	139	-0.021	0.80	0.012	0.88
DOF	139	-0.092	0.27	-0.080	0.34

